

Aus dem Institut für Immunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand/Direktor: Prof. Dr. Thomas Brocker

Plastizität von CD4-positiven T-Lymphozyten
im Kontext einer Helmintheninfektion

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marc Panzer
aus Bad Schwalbach
Jahr 2013

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. David Vöhringer

Zweitgutachterin: apl. Prof. Dr. Elfriede Nößner

Dekan: Prof. Dr. med Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2013

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse flossen in folgende Publikation mit ein:

„Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection“

Marc Panzer, Selina Sitte, Stefanie Wirth, Ingo Drexler, Tim Sparwasser und David Voehringer; J Immunol. 2012 Jan 15;188(2):615-23.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	8
Summary.....	9
2 Einleitung	10
<i>Grundlegende Mechanismen des Immunsystems von Säugern</i>	10
<i>Typ 1 und Typ-2-Immunantworten</i>	12
<i>Differenzierung von CD4-positiven T-Effektorzellsubtypen</i>	13
<i>Plastizität von CD4-positiven T-Effektorzellen</i>	17
<i>Autoimmune Erkrankungen</i>	19
Multiple Sklerose und das EAE-Mausmodell.....	20
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und das T-Zelltransfer Colitis-Mausmodell	21
<i>Immunmodulation durch Helminthen</i>	23
Das <i>Nippostrongylus-brasilensis</i> -Infektionsmodell	26
3 Fragestellung und Zielsetzung.....	28
4 Material und Methoden.....	29
4.1 <i>Material</i>	29
4.1.1 Biologische Materialien.....	29
4.1.2 Puffer und Kulturmedien.....	32
4.1.3 Antikörper	33
4.1.4 Zytokine & Zellkulturzusätze.....	33
4.1.5 Proteine & Peptide.....	34
4.1.6 Enzyme	34
4.1.7 Oligonukleotide.....	34
4.1.8 Kommerzielle Kits	35
4.1.9 Chemikalien & Reagenzien	35
4.1.10 Gerätschaften	36

4.1.11 Verbrauchsmaterialien	37
4.1.12 Software und Internetservice.....	38
4.2 Methoden	38
4.2.1 Zell- und immunbiologische Methoden	38
4.2.2 Parasitologische Methoden	45
4.2.3 Molekularbiologische Methoden	45
4.2.4 Tierexperimentelle Methoden	47
4.2.5 Statistik	51
5 Ergebnisse	52
<i>Das Nippostrongylus-brasilienensis/Ovalbumin-Infektionsmodell</i>	52
<i>Plastizität von CD4-positiven T-Effektorzellen im Kontext einer Wurmparasiteninfektion</i>	58
Plastizität von Th1-Zellen	58
Plastizität von Th17-Zellen	63
Plastizität von regulatorischen T-Zellen	66
<i>Modulation autoimmuner Mausmodelle durch eine Nippostrongylus-</i> <i>brasilienensis-Parasiteninfektion</i>	70
Modulation einer experimentell induzierten Encephalomyelitis	70
Modulation einer durch CD4-T-Zelltransfer induzierten Colitis.....	72
6 Diskussion.....	75
7 Literaturverzeichnis.....	85
8 Abkürzungen.....	100
9 Glossar.....	102
10 Eidesstattliche Versicherung	103
11 Publikationen & Preise	104
12 Danksagung.....	105

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Klassisches dichotomes Differenzierungsmodell von T-Helferzellen des Typ 1 und 2 ausgehend von naiven T-Vorläuferzellen in Mäusen.....	14
Abbildung 2. Modell immunmodulatorischer Mechanismen während einer <i>N. brasiliensis</i> -Infektion.	27
Abbildung 3. Der Parasit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> induziert eine protektive Th2-Polarisierung.	53
Abbildung 4. Expansion naiver OVA-spezifischer T-Helferzellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion.	55
Abbildung 5. Polarisierung naiver T-Helferzellen in IL-4 produzierende Th2-Zellen durch adoptiven Transfer und Nb/OVA-Infektion.	57
Abbildung 6. Schema der Repolarisierungsexperimente von <i>in vitro</i> hergestellten und <i>ex vivo</i> isolierten Th1-Zellen durch eine <i>N. brasiliensis</i> /Ovalbumin Infektion.	58
Abbildung 7. Effiziente Repolarisierung <i>in vitro</i> hergestellter Th1- in Th2-Zellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion.	60
Abbildung 8. IL-4/IL-13 unabhängige Repolarisierung antigenspezifischer Th1-Zellen in IL-4/IL13-defizienten Mäusen nach Nb/OVA-Infektion.	61
Abbildung 9. Vollständige Repolarisierung <i>ex vivo</i> isolierter Th1-Zellen in IL-4 exprimierende Th2-Zellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion.	62
Abbildung 10. Adoptiv transferierte, <i>in vitro</i> hergestellte Th17-Zellen exprimieren nach einer Nb/OVA-Infektion das Th2-Zytokin IL-4.	64
Abbildung 11. <i>Ex vivo</i> isolierte Th17-Zellen weisen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion eine hohe Flexibilität auf.	65

Abbildung 12. <i>In vitro</i> hergestellte regulatorische T-Zellen weisen eine nahezu stabile Differenzierung nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.	66
Abbildung 13. Ex vivo isolierte, natürliche regulatorische T-Zellen weisen keine Plastizität nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.	68
Abbildung 14. Ex vivo isolierte, natürliche regulatorische T-Zellen aus IL-4eGFP-Reporter-mäusen weisen keine Plastizität nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.	68
Abbildung 15. Effizienz der <i>N. brasiliensis</i> /OVA induzierten Th2-Repolarisierung von Th1, Th17 und Treg-Zellen.	69
Abbildung 16. Untersuchung der Autoimmunmodulation in verschiedenen EAE-Mausmodellen durch eine <i>N. brasiliensis</i> Infektion.	71
Abbildung 17. Transiente Modulation einer T-Zelltransfer-Colitis durch eine <i>N.-brasiliensis</i> -Infektion.	73

1 Zusammenfassung

Das Immunsystem von Säugern wird durch Pathogene, Allergene oder ebenso durch körpereigene Autoantigene stimuliert. Diese Stimulation resultiert in einer Differenzierung von CD4-positiven T-Zellen, die je nach eingeleiteter Immunantwort ihre entzündungsfördernden oder hemmenden Effektorfunktionen ausüben können. Basierend auf den funktionellen Eigenschaften und einem spezifischen Transkriptionsfaktorprofil sowie Zytokinsekretionsprofil lassen sich diese reaktiven Effektorzellen in Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Subtypen unterscheiden. Vereinzelt scheinen einige der Subtypen dennoch in der Lage, Eigenschaften von entgegengesetzt polarisierten Zellsubtypen annehmen zu können, was von einem wissenschaftlichem Interesse ist und für zukünftige Therapiemethoden genutzt werden könnte. Aus diesem Grund wurde für eine Untersuchung der Plastizität von CD4-positiven Effektorzellen ein adoptives Zelltransfer-Mausmodell in Kombination mit einer Infektion der Empfängertiere durch den gastrointestinalen Wurmparasiten *Nippostrongylus brasiliensis* entwickelt. Das Infektionsmodell erlaubte durch die Induktion einer starken Typ-2-Immunantwort durch den Parasiten zu untersuchen, ob *in vitro* polarisierte oder *ex vivo* isolierte Th1-, Th17- sowie Treg-Zellen in einen entgegengesetzten, IL-4 produzierenden Th2-Phänotyp *in vivo* differenzieren können. Sowohl Th1-, als auch Th17-Zellen konnten neben dem Verlust ihrer charakteristischen IFN- γ bzw. IL-17A Zytokinsekretion IL-4 exprimieren und somit in den Th2-Subtyp konvertiert werden. Im Gegensatz dazu wiesen *in vitro* hergestellte und *ex vivo* isolierte Treg-Zellen diese Flexibilität nicht auf und behielten weitgehend ihr spezifisches Transkriptionsfaktorprofil bei.

Diese neuen Erkenntnisse zur Plastizität von CD4-positiven Effektorzellen könnten darüber hinaus die inverse Korrelation von Helmintheninfektionen und ihrem vermittelnden Schutz vor autoimmunen und allergischen Erkrankungen erklären. Aus therapeutischer Sicht erscheint eine Verschiebung von unkontrollierten und autoreaktiven Th1- und Th17-Immunantworten in Autoimmunerkrankungen durch eine Helmintheninfektion hin zu einer protektiven Th2-Antwort sinnvoll. Um dies weiterführend zu überprüfen und zu klären, ob eine Th-Repolarisierung ein zugrunde liegender Mechanismus ist, wurde versucht zwei verschiedene autoimmune Mausmodelle durch eine Infektion mit dem Helminthen zu modulieren und den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern. Es konnte jedoch lediglich eine transiente Verbesserung des Krankheitsverlaufs in einem Colitis-Mausmodell, aber nicht in einem Mausmodell ähnlich der Multiplen Sklerose durch den Helminthen *N. brasiliensis* beobachtet werden.

Summary

Stimulation of the immune system by pathogens, allergens or autoantigens leads to differentiation of CD4 positive T cells with pro- or anti-inflammatory effector cell functions. Based on functional properties and expression of characteristic cytokines and transcription factors effector CD4 positive T cells have been grouped mainly into T helper type 1 (Th1), Th2, Th17 and regulatory T (Treg) cells. At least some of these T cell subsets remain responsive to external cues and acquire properties of other subsets raising the hope that this functional plasticity might be exploited for therapeutic purposes. Regarding this matter an antigen-specific adoptive transfer model combined with the infection of recipient mice by the gastrointestinal helminth *Nippostrongylus brasiliensis* was established. This Th2 immune response inducing infection model permitted to test whether *in vitro* polarized or *ex vivo* isolated Th1, Th17 or Treg cells can be converted into IL-4 expressing Th2 cells *in vivo*. Th1 and Th17 cells could be repolarized to acquire the expression of IL-4 and lose the expression of their characteristic cytokines IFN- γ and IL-17A, respectively. In contrast, both *in vitro* generated and *ex vivo* isolated Treg cells were largely resistant to repolarization and retained their specific master transcription factor profile.

These findings provide new insights into the functional plasticity of T effector cells and this helminth-induced conversion of Th1 or Th17 cells into Th2 cells may partially explain the inverse correlation between helminth infection and protection against autoimmune disorders. An obvious therapeutic strategy could therefore be based on shifting the uncontrolled and autoreactive Th1 or Th17 response of autoimmune disease by helminth infections to counteract their proinflammatory actions. Regarding this and to test if the observed T cell repolarization into protective Th2 cells is an underlying mechanism two different mouse models of autoimmune disease were tried to modulate by the parasite infection. Solely a transient modulation effect in colitis-induced mice but not in a multiple sclerosis-like mouse model by *N. brasiliensis* could be observed.

2 Einleitung

Grundlegende Mechanismen des Immunsystems von Säugern

Das Immunsystem höherer Lebewesen umfasst lymphoide Organe, Zellen und Moleküle, die durch eine regulierte Kooperation Immunität gegen von außen eindringende Organismen oder Fremdkörper vermitteln. Diese Mechanismen zur Identifizierung sowie zur anschließenden Neutralisierung und Beseitigung der körperfremden Bestandteile lassen sich formell in eine angeborene und eine erworbene Immunität unterteilen, obwohl beide Arme des Immunsystems tatsächlich eng ineinander greifen. Das angeborene Immunsystem stellt dabei eine erste einfachere, nicht-adaptive Verteidigungslinie gegen Pathogene dar und beinhaltet zelluläre sowie humorale Faktoren. Neben Makrophagen (Mø), natürlichen Killerzellen (NK) und neutrophilen Granulozyten, die zu den zellulären Faktoren zählen und den humoralen Faktoren des Komplementsystems im Blut, bieten vor allem die Haut und die Mukosa einfachen Schutz in Form einer mechanischen Barriere. Durch die grundlegenden Mechanismen einer nicht-varianten Pathogenstruktur-Erkennung über spezialisierte Zellrezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptors* wie z.B. *Toll-like* Rezeptoren), die bereits in Invertebraten (wie *Drosophila melanogaster*; Ferrandon et al., 2007) und Pflanzen (wie *Arabidopsis thaliana*; Ryan et al., 2007) zu finden sind, wird von einer entwicklungsgeschichtlich frühen Entstehung dieses Arms des Immunsystems ausgegangen. Generell können über eine begrenzte Anzahl dieser Rezeptoren invariante mikrobakterielle Hauptbestandteile, sogenannte PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), wie Lipopolysaccharide (LPS), Lipopeptide, Flagelline oder nicht-methylierte DNA erkannt und eine entsprechende Immunantwort eingeleitet werden. Gelingt es jedoch das Voranschreiten der Infektion durch die beschriebenen Vorrichtungen der angeborenen Immunität nicht ausreichend einzudämmen, greifen weiterführende adaptive Mechanismen des erworbenen Immunsystems.

Diese Mechanismen werden, wie der Name andeutet, erst mit zunehmenden Antigenkontakten erworben und sind durch eine komplexere, adaptive Immunantwort charakterisiert, die ebenfalls auf zellulärer und humoraler Ebene agieren kann. Antigenspezifische T-Lymphozyten, zu denen CD4-positive T-Helferzellen (Th) und zytotoxische CD8-positive T-Zellen (CTL) zählen, entstehen ursprünglich im Knochenmark wandern jedoch in den Thymus wo sie ihre Reifung schließlich vollenden. T-Lymphozyten sind Bestandteil der zellulären Ebene und vermitteln die adaptive Immunantwort bzw. sind direkt in der Lage Fremdanigen-präsentierende Zellen zu lysieren, um einen intrazellulär lokalisierten Erreger zu eliminieren. Die Erkennung eines Antigens setzt im Fall durch T-Lymphozyten einen

antigen-präsentierenden Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC bzw. im Menschen humanes Leukozyten-Antigen, HLA) auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) voraus. T-Helferzellen erkennen dabei über ihren klonalen T-Zellrezeptor (TZR) ausschließlich spezifisches Antigen, welches auf MHC-Molekülen der Klasse II präsentiert wird. CD8-positive T-Zellen hingegen erkennen nur solche Antigene auf MH-Komplexen des Typs I. Zusätzlich zu diesem TZR-Signal wird eine weitere Kostimulation über die Wechselwirkung des CD28-Rezeptors auf der T-Zelloberfläche mit den Liganden CD80/CD86 auf der APZ benötigt, um eine vollständige T-Zellaktivierung, weitere Faktoren wie Zytokine und Chemokine vorausgesetzt, einzuleiten.

Die humorale Ebene der erworbenen Abwehrreaktion ist durch die Bildung spezifischer Antikörper definiert, die von zu Plasmazellen differenzierten B-Zellen sezerniert werden. Durch ihre Fähigkeit zur spezifischen Erkennung und Bindung von Antigenen stellen diese Immunglobuline eine zentrale Rolle im Immunsystem dar. Neben der Opsonierung und Neutralisierung von Erregern, ermöglichen sie die Aktivierung des Komplementsystems und somit die Verknüpfung zur angeborenen Immunität. B-Zellen entstehen wie T-Lymphozyten ursprünglich im Knochenmark differenzieren jedoch im Gegensatz in diesem primär-lymphatischen Organ. Nach einer ersten Abwehrreaktion in der nur antigenspezifische B-Zellklone expandieren und in Plasmazellen differenzieren, können weitere B-Zellen dieses Klon in sogenannte Gedächtniszellen differenzieren. Dieser Zelltyp stellt die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses dar. Bei einem wiederholten Kontakt mit dem Erreger kann durch das Auftreffen des Antigens auf jene Gedächtniszelle eine rasche und amplifizierte Sekundärantwort, die zuvor erworben wurde, ermöglicht werden.

Der Schlüssel des Immunsystems zur raschen und spezifischen Bekämpfung von Pathogenen liegt in der hohen Variabilität der T- bzw. B-Zellrezeptoren (BZR), die Antigene erkennen und somit eine adaptive antigenspezifische Immunantwort einleiten können. Im Gegensatz zu den beschriebenen PRR des angeborenen Immunsystems sind diese Rezeptoren jedoch nicht in der Keimbahn kodiert und können ausgehend von verschiedenen Gensegmenten in zufälliger Kombination, was als V(D)J-Rekombination bezeichnet wird, zusammengesetzt werden. Dieser Vorgang erlaubt die Herstellung von mehr als 10^9 verschieden spezifischen B- oder T-Zellklonen, die das immunologische Repertoire und somit die notwendige Diversität zur Erkennung unzähliger Erreger darstellen. Der Mechanismus der somatische Hypermutation bietet darüber hinaus, nach der Erkennung eines Antigens durch einen bestimmten Rezeptorklon und der anschließenden Expansion zu einer klonalen B-Zellpopulation, die Möglichkeit den Rezeptor zusätzlich an das Antigen weiter anzupassen, um einen noch affineren Rezeptor zu erzeugen. Je nach Antigen und umgebendes Organ werden dabei verschieden ausgerichtete Immunantworten eingeleitet.

Typ 1 und Typ-2-Immunantworten

Eine Immunantwort gegen infektiöse Erreger wird funktionell in zwei grundlegende Typen unterschieden, die sich durch eine reziproke Regulation gegenseitig ausschließen. Diese Kontrolle ermöglicht in einer frühen Phase nach dem Erregerkontakt eine deutliche Polarisierungsrichtung der entsprechenden T-Helferzellpopulation und damit eine Einleitung des jeweiligen Typs der Immunantwort.

Eine Typ 1-Immunantwort ist durch die Entstehung und Beteiligung CD4-positiver T-Lymphozyten des Typ 1 gekennzeichnet und ist gegen bakterielle und virale Erreger gerichtet. Die T-Helferzellen dieses Subtyps Th1 exprimieren nach Antigenkontakt die Typ 1 spezifischen Zytokine Interferon Gamma (IFN- γ), Interleukin 2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α). Neben der Differenzierung zu Th1-Gedächtniszellen und ihrer Beteiligung an dem Klassenwechsel in B-Zellen hin zu Immunglobulin G2 (IgG2), vermitteln Th1-Zellen nach ihrer Expansion vor allem die Aktivierung von Makrophagen durch die sezernierten Zytokine IL-2 und IFN- γ . Diese somit klassisch aktivierten Makrophagen, die wiederum weitere entzündungsfördernde Zytokine ausschütten können, sind zudem in der Lage infizierte Zellen zu phagozytieren. Ähnlich antigenspezifischer CTL, die ebenfalls Zellen die den Erreger in sich tragen lysieren können, zählen Makrophagen und NK-Zellen neben dem beschriebenen CD4-Subtyp von T-Helferzellen zu den zellulären Faktoren einer Typ-1-Immunantwort.

Der zweite Typ einer Immunantwort ist gegensätzlich mit Parasiteninfektionen oder in einer unkontrollierten Antwort mit Hypersensibilisierungsreaktionen wie Allergien oder allergischem Asthma assoziiert. Dieser Arm ist ebenfalls durch die bisher nicht vollständig verstandene Kooperation von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems gekennzeichnet. Aus histopathologischer Sicht ist zumeist eine vermehrte Schleimbildung durch die Aktivierung von Becherzellen in den betroffenen Organen und die Akkumulation eosinophiler und basophiler Granulozyten (Eosinophilie und Basophilie) sowie eine Lokalisierung von Mastzellen (Mastozytose) zu beobachten. Maßgeblich trägt jedoch die Polarisierung von Th-Zellen in den Typ 2 (Th2) und deren Sekretion von Typ 2 Zytokinen zu einer Amplifikation von Effektormechanismen und der Eliminierung von Parasiten bei. Die Funktion dieser Effektorzellen wird vor allem durch IL-4 und IL-13 regulierte Signalwege und der Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT6 (*signal transducer and activator of transcription*, Hou et al., 1994), einem Transkriptionsfaktor der zahlreiche weitere Typ 2-assoziierte Gene reguliert, induziert. Die STAT6-Signalkaskade ist vor allem für die lokale Rekrutierung eosinophiler und basophiler Granulozyten sowie von Th2-Zellen selbst wichtig. Der eine Typ-2-Immunantwort kennzeichnende hohe IgE-Serumspiegel wird durch den ebenso Th2-vermittelten Klassenwechsel in B-Zellen hin zu IgG1 und IgE eingeleitet und ist wiederum von Th2-Zellen ausgeschüttetem IL-4 und IL-13 abhängig (Liu et al., 2005; Snapper et al., 1988; Voehringer et al., 2006). Die Immunglobuline G1 und E verknüpfen zudem das

angeborene und erworbene Immunsystem. Sie werden von den Isotyp-spezifischen Oberflächenrezeptoren $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ (Rezeptoren I und III, welche die Fc-Region (*fragment crystallizable*) von Ig erkennen) auf Mastzellen und basophilen Granulozyten gebunden und führen durch ihre Kreuzverknüpfung zur Degranulation und damit zur Freisetzung granulär gespeicherter Histamine und Zytokine. Neben diesen Botenstoffen von Mastzellen können weitere Zytokine und Chemokine von Th2-Zellen den Fortgang der Immunantwort vermitteln. Durch ihre direkte Wirkung auf glatte Muskel- und Epithelzellen sowie Zellen der Mukosa, kann eine weitere Akkumulation basophiler Granulozyten und Mastzellen durch IL-3 und eosinophiler Granulozyten durch IL-5 eingeleitet werden (Dabbagh et al., 1999; Dent et al., 1990; Lantz et al., 1998; Wills-Karp et al., 1998).

Aus den aufgeführten Gründen weisen CD4-positive T-Helferzellen eine Schlüsselfunktion in der Induktion und Vermittlung von Immunantworten gegen mikrobielle und virale als auch gegen parasitäre Erreger auf.

Differenzierung von CD4-positiven T-Effektorzellsubtypen

Die klassischen T-Helferzellsubtypen Th1 und Th2 werden durch entsprechende Signale ausgehend von Zellen des angeborenen Immunsystems in ihrer Differenzierung stark polarisiert. Diese beiden reziprok regulierten Zelltypen der erworbenen Immunität können durch ihre jeweilige Th-Effektorfunktion Immunantworten in der entsprechenden Richtung grundlegend induzieren und vermitteln. In den letzten Jahren konnten jedoch zusätzlich zu den klassischen Subtypen weitere CD4-positive T-Zellpopulationen, wie solche des Typs 17, identifiziert und definiert werden. Ähnlich des Typs 1 und Typs 2, die durch die Expression der Schlüsselzytokine $\text{IFN-}\gamma$ bzw. IL-4 charakterisiert werden, lassen sich Th17-Zellen die Subtyp-spezifischen Zytokine IL-17A und IL-17F zuordnen (Harrington et al., 2005; Ivanov et al., 2006). Neben der Rolle dieses Zelltyps in der Abwehr von Hefen und Bakterien (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Mangan et al., 2006) sind Th17-Zellen zusammen mit Th1-Zellen vor allem mit autoimmunen Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder der Kollagen-induzierten Arthritis assoziiert (Langrish et al., 2005; Murphy et al., 2003). Eine weitere eng mit der Differenzierung von Th17-Zellen verknüpfte CD4-Effektorzellpopulation ist die der regulatorischen T-Zellen, die im Thymus entstehen aber auch in der Peripherie induziert werden können. Dieser Zelltyp kann durch direkten Zellkontakt oder durch die Sezernierung der Zytokine IL-10 und $\text{TGF-}\beta$ (*transforming growth factor beta*) eine Immunsuppression vermitteln und so überschießende Immun-antworten oder reaktive Zellen regulieren. Ihr enormes TZR-Repertoire gegen körpereigene Antigene verdeutlicht die maßgebliche Beteiligung dieses T-Zellsubtyp an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Hsieh et al., 2004; Sakaguchi, 2005; Schwartz, 2005).

Neben der Definition von CD4-Effektorzellen anhand ihrer spezifischen Zytokin-expressionsmuster werden zusätzlich Transkriptionsfaktoren wie T-bet (*T-box transcription factor* TBX21) für Th1-Zellen, GATA3 (*Trans-acting T-cell-specific transcription factor*) für Th2-Zellen, ROR α/γ (*RAR-related orphan receptor alpha/gamma*) für Th17-Zellen sowie Foxp3 (*forkhead box P3*) für Treg-Zellen unterschieden. Diese Faktoren sind, wie im Fall von Th1- und Th2-Zellen bereits gezeigt wurde, vor allem für die initiale Differenzierungs- und Polarisierungsphase, nicht aber für die Aufrechterhaltung der spezifischen Zytokinexpression wichtig (Mullen et al., 2002; Zhu et al., 2004). Die molekularen Differenzierungs- und Polarisierungsmechanismen ausgehend von naiven Vorläuferzellen sind jedoch Gegenstand aktueller Forschung und werden zunehmend mehr verstanden (Übersichtsartikel Ansel et al., 2006; Lee et al., 2006; Murphy et al., 2002; Zhu et al., 2010b).

Die Abbildung 1 stellt die beschriebenen CD4-positiven T-Zellpopulationen und deren spezifische Zytokinexpressionsmuster und Transkriptionsfaktoren zusammenfassend dar. Zusätzlich ist das von Mosmann und Coffman Ende der achtziger Jahre entwickelte dichotome Modell der Th-Zelldifferenzierung und -polarisierung (Mosmann et al., 1989), das jedoch durch neuere Befunde in einigen postulierten Punkten zunehmend in Frage gestellt ist, integriert.

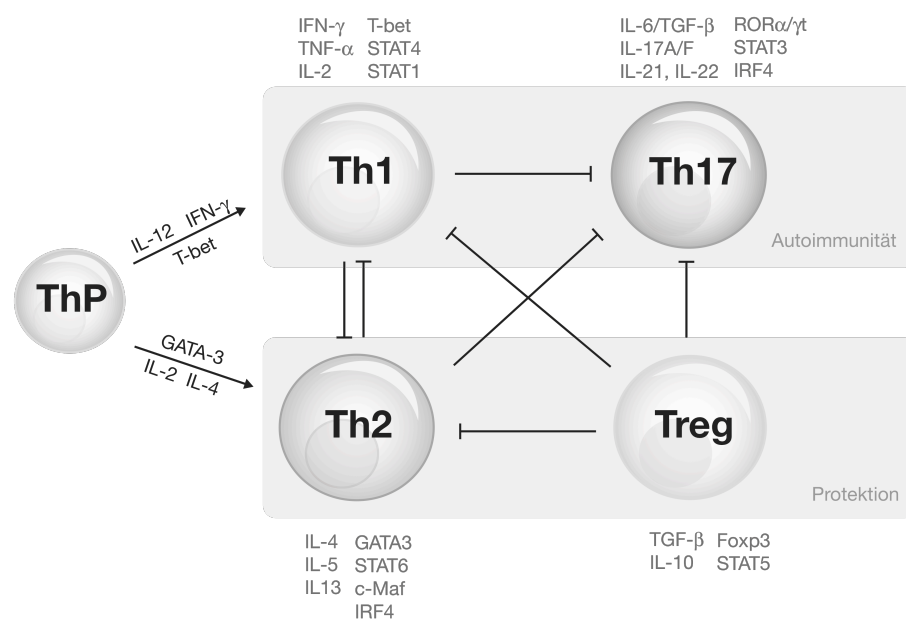


Abbildung 1. Klassisches dichotomes Differenzierungsmodell von T-Helferzellen des Typ 1 und 2 ausgehend von naiven T-Vorläuferzellen in Mäusen.

T-Helferzellen des Typ 1 (Th1) sowie des Typ 2 (Th2) differenzieren nach Antigenkontakt ausgehend von naiven Th-Vorläuferzellen (ThP). Die Einteilung der Th-Subtypen inklusiver neuerer CD4⁺ Subtypen (Tregs und Th17) erfolgt aufgrund der Expression selektiver Markerzytokine bzw. Markertranskriptionsfaktoren (über den jeweiligen Typen gelistet). Ausgehend von *in vitro* gewonnenen Daten aus Th-Klonen wurden ursprünglich stabile ausdifferenzierte CD4-positive Subtypen postuliert, die sich in ihrer Differenzierung gegenseitig ausschließen. Neuere Befunden der Zelltypen Th17 und Treg sind inklusive ihrer spezifischen Signatur-Zytokine und Transkriptionsfaktoren in das ursprünglich von Mosmann und Coffman (Mosmann et al., 1989) entwickelte dichotome Modell integriert.

CD4-positive T-Zellen differenzieren nach einem Antigenkontakt in der Peripherie von naiven T-Helfervorläuferzellen aus. Eine simultane Expression der hochaffinen IL-12-Rezeptor $\beta 2$ -Untereinheit (IL-12R $\beta 2$) und eines IL-4-Rezeptors ermöglicht Vorläuferzellen dabei, je nach Erreger und damit vorherrschendem Zytokinmilieu, durch IL-4 oder IL-12 in die zwei grundlegenden Immunantworten und somit in den Th1- oder Th2-Subtyp zu differenzieren sowie anschließend klonal zu expandieren (Smits et al., 2001). Neben der Zytokinrezeptor-vermittelten Polarisierung scheinen vermutlich auch andere Rezeptoren, wie Notch-Rezeptoren, in der Lage, in Abhängigkeit des durch dendritischen Zellen präsentierten Ligandentyps, Einfluss auf die Differenzierung von Helferzellen zu nehmen (Amsen et al., 2004). Darüber hinaus sind weitere Faktoren wie die Antigenkonzentration und Antigenaffinität zum TZR, sowie kostimulatorische Interaktionen zwischen B7- und CD28- oder CD40- und CD40L-Oberflächenmolekülen der Th-Zellen und APZ, im Immunisierungsprozess und dessen Regulation beteiligt (zusammengefasst in Wan et al., 2009; Zhu et al., 2008; Zhu et al., 2010b). Nach der initialen Differenzierung ausgelöst durch die Antigenbindung am T-Zellrezeptor, beginnen Th1-Zellen IFN- γ und TNF- α zu sezernieren. Dies wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 durch IFN- γ und IL-2, der wiederum die Expression des Faktors T-bet induziert, eingeleitet (Hsieh et al., 1993; Lighvani et al., 2001). Der Th1-spezifische Faktor T-bet induziert sich durch eine Rückkopplungsschleife selbst und neben weiteren Chromatinmodifikationen zur Öffnung des IFN- γ -Lokus die Expression der IL-12R $\beta 2$ -Kette. Durch die beiden Wege der Signalkaskade, sowohl TZR- als auch IL-12R-vermittelte Signale, können schließlich terminal ausdifferenzierte Th1-Zellen eine kontinuierliche IFN- γ -Sekretion erzielen (Murphy et al., 2002). Die TZR-Signalkaskade ist dabei vermutlich in einer frühen Polarisierungsphase von Bedeutung, wohingegen IL-12 eine wichtige Rolle in der weiteren Stabilisierung des Phänotyps über den IL-12R-Signalweg spielt (Schulz et al., 2009).

Die Entwicklung von Th2-Zellen wird neben später in der Entwicklung beteiligten Faktoren wie c-Maf und IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*), hauptsächlich über die Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT6, das wiederum die Expression des Th2-spezifischen Transkriptionsfaktors GATA3 einleitet, gesteuert. Dieser Faktor wird durch Antigenkontakt und dem Zytokin IL-4 über TZR- bzw. IL-4R-vermittelte Signale aktiviert. Neben diesem Schlüsselzytokin, welches somit direkt für die Entwicklung von Th2-Zellen über STAT6 den essentiellen Transkriptionsfaktor GATA3 induzieren kann (Ho et al., 2009; Le Gros et al., 1990), produzieren Th2-Zellen darüber hinaus IL-3, IL-5, IL-13, IL-25 und IL-31. Diese Zytokine sind ebenfalls an der Immunität gegen Parasiten und an den entsprechenden Signalkaskaden zur Induktion der Immunglobuline G1 und E in B-Zellen beteiligt.

Die Population von Th17-Zellen ist durch die Produktion der entzündungsfördernden Zytokine IL-17A und IL-17F, IL-6, IL-21 und IL-22 und der Expression der spezifischen Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α definiert (Harrington et al., 2005; Ivanov et al., 2006;

Park et al., 2005). Die Differenzierung ist von IL-6 und TGF- β abhängig (Bettelli et al., 2006b; Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), jedoch weder im murinen noch humanen System vollständig aufgeklärt. Von murinen Th17-Zellen ist jedoch bekannt, dass die spezifische Expression des Transkriptionsfaktors ROR γ t von TGF- β abhängig ist und in Anwesenheit von IL-6 eine Expression von IL-21 und des IL23-Rezeptors induziert wird. Dies hat eine weitere Forcierung vermutlich durch autokrine Rückkopplung und somit Stabilisierung des Th17-Phänotyps über IL-21 und IL-23 zur Folge. Im humanen System scheint diese Differenzierung jedoch von IL-1 oder IL-23 auszugehen (Übersichtsartikel Hirahara et al., 2010). Wie im Vergleich zu den beschriebenen Helferzellsubtypen wird die Differenzierung von Th17-Zellen ebenfalls über einen STAT-Transkriptionsfaktor reguliert. IL-6 und IL-23 aktivieren den Faktor STAT3, der wiederum die Expression der Zytokingene *IL21*, *IL21r* und *IL23r* positiv beeinflusst. Die Schlüsselrolle von STAT3 wird durch die Regulation und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ROR α , ROR γ t, IRF4 und BATF (*Basic leucine zipper transcription factor*) verdeutlicht (Zusammengefasst in Dong, 2009; Korn et al., 2009; Yang et al., 2008b).

Neben den T-Helferzellsubtypen repräsentieren regulatorische T-Zellen, die im Thymus (nTreg) entstehen oder in der Peripherie durch IL-2 und TGF- β aus naiven CD4⁺CD25⁻ T-Zellen hervorgehen können (iTreg), eine weitere eigenständige CD4-T-Zellpopulation (Josefowicz et al., 2009). Sie sind jedoch durch das Zytokin TGF- β eng mit der Differenzierung von Th17-Zellen verknüpft, das in Abwesenheit von IL-6 die beiden Transkriptionsfaktoren ROR γ t und das Treg-spezifische Foxp3 induzieren kann. Der dominante Faktor Foxp3 antagonisiert jedoch die ROR γ t-Funktion und bewirkt somit eine Treg- anstatt Th17-Polarisierung (Zhou et al., 2008). Beiden Treg-Subtypen ist die Expression des Faktors Foxp3 durch TGF- β , der die weitere Differenzierung sowie die Expression von Genen, mit immunsupprimierender Wirkung steuert, gemein (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Der Faktor STAT5, der vermutlich das *foxp3*-Gen direkt binden kann und durch TGF- β und IL-2 aktiviert wird, weist eine weitere zentrale Rolle in der Differenzierung von Treg-Zellen auf. Neben der positiven Regulation des Treg-Differenzierungsstatus wird auch eine inhibierende Funktion der Th17-Polarisierung von STAT5 vermutet, da in STAT5-defizienten Mäusen erhöhte IL-17-Serumlevel beobachtet werden (Laurence et al., 2007).

Die STAT-vermittelte Balance zwischen Treg- und Th17-Zellen verdeutlicht die reziproke Regulation des Differenzierungszustands von CD4-Effektorzellen. Auf Zytokin- und Transkriptionsfaktorebene wird dies besonders am Beispiel der gegenseitigen Inhibition von Th1 und Th2-Zellen deutlich. IFN- γ als Markerzytokin und T-bet als spezifischer Faktor von Th1-Zellen hemmen neben der Polarisierung des Th1-Phänotyps die Differenzierung von Th2- und Th17-Zellen (Bettelli et al., 2006b; Lazarevic et al., 2011; Romagnani, 1997). Ähnliche supprimierende Eigenschaften weisen auch IL-4, GATA3 oder STAT6 durch negative und positive Rückkopplungsschleifen auf, die innerhalb differenzierter Th2-Zellen durch die

Unterdrückung typfremde Th1- oder Treg-Faktoren beschrieben sind (Dardalhon et al., 2008; Murphy et al., 2002; Ouyang et al., 1998; Zheng et al., 1997).

Neben den Zytokin- oder faktorregulierten Differenzierungsmechanismen spielen epigenetische Chromatinstruktur-Modellierungen, die an die Tochterzellen weitergegeben werden können, eine weitere wichtige Rolle in der Polarisierung und reziproken Regulation (Wilson et al., 2009). Für Th1- und Th2-Zellen ist die Modulation des *IL4/IL13*- bzw. des *Ifng*-Lokus und zahlreicher Th1- und Th2-spezifischer Zytokinloci im Zuge der Differenzierung bekannt. Hauptsächlich sind aktive Methylierungsmuster der Histone, welche die Chromatinstruktur organisieren und somit über eine offene oder geschlossene Struktur entscheiden, in den entsprechenden Signatur-Zytokinen beschrieben (Agarwal et al., 1998; Ansel et al., 2006; Hatton et al., 2006; Mullen, 2002; Schoenborn et al., 2007). So weist auch der *IL17F*-Lokus ausschließlich in Th17-Zellen Acetylierungsmuster auf, die auf eine offene und somit aktive Form des Chromatins (Euchromatin) schließen lassen (Akimzhanov et al., 2007). Ähnliche Befunde konnten in murinen und humanen Treg-Zellen in Form von demethylierten Histonen, die wiederum Euchromatin charakterisieren und mit aktiver Genexpression des *Foxp3*-Lokus verknüpft sind, gefunden werden (Floess et al., 2007; Kim et al., 2007).

Plastizität von CD4-positiven T-Effektorzellen

Das von Mosmann und Coffman 1989 entwickelte dichotome Modell der Th1- und Th2-Zelldifferenzierung ist nicht nur mit der Definition neuerer Subtypen wie Th17 und Treg-Zellen in seinem Verständnis erschwert worden, sondern bietet auch zunehmend keine Grundlage mehr, neuere Befunde zu erklären. Basierend auf *in vitro* Studiendaten, die zunächst anhand klonaler Th2- oder Th1-Zelllinien und später anhand *in vitro*-differenzierter Th-Zellen erhoben wurden, prägte sich eine Vorstellung von terminal ausdifferenzierten und somit in ihrem Phänotyp stabilen Th-Zellsutypen (Mosmann et al., 1986; Murphy et al., 1996). Trotz einiger Studien, die zeigten, dass mit zunehmenden Zellteilungen und Antigen-Stimulierungsrunden eine Repolarisierung von Th-Zellen *in vitro* unter entgegen gesetzten Kulturbedingungen erschwert wird (Grogan et al., 2002; Murphy et al., 1996), wurde bereits ein Maß an Plastizität ausdifferenzierten CD4-Effektortypen anhand der Expression typfremder Markerzytokine in *in vitro* Experimenten zugeschrieben (Übersichtsartikel Murphy et al., 2010; O'Shea et al., 2010; Zhu et al., 2010a). Mit Hilfe ektopischer Expression der Transkriptionsfaktoren GATA3 oder T-bet in polarisierten Th1- oder Th2-Zellen konnte zunächst die grundsätzliche Möglichkeit der IL-4 und IFN- γ Induktion in entgegengesetzt polarisierten Th-Zellen gezeigt werden (Lee et al., 2000; Szabo et al., 2000). Die Repolarisierung humaner Th1- oder Th2-Gedächtniszellen in wiederum entgegengesetzt polarisierenden Kulturbedingungen und die Entstehung humaner Tregs aus einer bestehenden T-Gedächtniszellpopulation, unterstrichen diese frühen Befunde

der Plastizität (Messi et al., 2003; Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Weitere Studien der letzten Jahre führten neue Erkenntnisse an. So konnte für *in vitro* hergestellte murine sowie für *ex vivo* isolierte humane und murine Th2-Zellen eine Koexpression der Markerzytokine IL-4 gemeinsam mit IFN- γ und IL-4 mit IL-17F beschrieben werden (Krawczyk et al., 2007; Lohning et al., 2008; Wang et al., 2010). Die Kultivierung von Th2-Zellen mit dem Th17/Treg-spezifischen Zytokin TGF- β führt zudem zu einem Stopp der IL-4-Sekretion und stattdessen zu einer IL-9 Expression (Veldhoen et al., 2008). Ungeachtet der noch bestehenden Diskussion über eine weitere möglicherweise neue „Th9“-Population – da auch IL-9-positive Th17- und iTreg-Zellen beschrieben wurden (Elyaman et al., 2009; Lu et al., 2006; Nowak et al., 2009) und ein Nachweis eines spezifischen Transkriptionsfaktors innerhalb IL-9 positiver Th-Zellen bislang fehlt – deutet dieser Phänotyp dennoch auf einen instabilen und flexiblen Th2-Phänotyp hin.

Im Gegensatz zur unlängst publizierten Plastizität von Th17-Zellen, die in Richtung eines Th1-Phänotyps durch den Nachweis der T-bet und IFN- γ Expression postuliert ist (Bending et al., 2009; Lee et al., 2009; Lexberg et al., 2010; Shi et al., 2008), ist eine Flexibilität von nTreg- und iTreg-Zellen bislang unklar und Gegenstand aktueller Forschung. So wird in einigen Studien postuliert, dass *ex vivo* isolierte nTregs im Gegensatz zu iTregs durchaus IL-17 und IFN- γ exprimieren können (Wei et al., 2009; Yang et al., 2008a; Zhou et al., 2009). Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigen jedoch andere, dass nTregs in ihrer Foxp3-Expression stabil und nicht in weitere Subtypen konvertierbar sind (Komatsu et al., 2009; Rubtsov et al., 2010). Einige Hinweise deuten aber auf eine generelle Möglichkeit der Expression typfremder Transkriptionsfaktoren in Treg-Zellen hin. Bei einer genomweiten Analyse der Histon-methylierungsmuster von Promotoren CD4-positiver Effektorzellen wurde zwar entdeckt, dass die Gene *Il4*, *Ifng* und *Il17* in Treg-Zellen weder repressive (Trimethylierung des Lysins 27 von Histon 3, H3K27me3) noch offene (Trimethylierung des Lysins 4 von Histon 3, H3K4me3) Methylierungsmuster aufweisen, aber die Genpromotoren der Faktoren T-bet und GATA3 mit beiden Methylierungsmustern assoziiert sind (Wei et al., 2009). Somit wären Treg-Zellen prinzipiell durch die offene Chromatinstruktur zugänglich und für eine Aktivierung über subtypfremde Transkriptionsfaktoren bereit. Eine vergleichbare Situation - inaktive Markerzytokinloci aber aktive und permissive Methylierungsmuster der entgegengesetzten Haupttranskriptionsfaktoren - wurde in dieser Studie auch für die anderen Th-Subpopulationen aufgeführt.

Allen mit wenigen Ausnahmen veröffentlichten Studien gemein ist, dass die Befunde anhand von *in vitro* Untersuchungen erhoben und an *in vitro* differenzierten oder *ex vivo* isolierten Zellen durchgeführt wurden. Dies reflektiert jedoch nicht oder nur ungenügend die Situation in einem Organismus und die dort vorherrschenden Bedingungen. Kürzlich konnten jedoch Hegazy et al. zeigen, dass *in vitro* differenzierte antigen-spezifische Th2-Zellen im Kontext

einer Virusinfektion abhängig von der $\beta 2$ -Untereinheit des IL-12-Rezeptors zusätzlich zur IL-4-Expression IFN- γ sezernieren können (Hegazy et al., 2010). Weitere Hinweise zur Plastizität von Th-Zellen *in vivo* ergaben sich auch aus der Untersuchung von Multiple Sklerose (MS) Patienten und MS-ähnlichen Mausmodellen. In diesem Zusammenhang konnten Zellen mit einem gemischtem Th1/Th17-Phänotyp erstmals beobachtet werden (Annunziato et al., 2007; Kebir et al., 2009; McGeachy et al., 2007). Darüber hinaus wurden in einem murinen Asthmadmodell IL-17-positive Th2-Zellen, die sowohl beide Haupttranskriptionsfaktoren GATA3 als auch ROR γ t exprimierten, gefunden (Wang et al., 2010).

Aus therapeutischer Sicht und unter Betrachtung antigenspezifischer Immuntherapien ist die bislang meist nur *in vitro* beobachtete, postulierte Plastizität von ausdifferenzierten T-Helferzellen beachtenswert. Ähnlich der zum Teil erfolgreich angewandten Applikation von Treg-Zellen zur Unterdrückung überschießender Immunantworten gegen Pathogene (Belkaid et al., 2005) ist das Potential im Bezug auf die antigenspezifische Repolarisierung autoreaktiver Th-Zellen hin zu protektiven Subtypen innerhalb autoimmuner Erkrankungen enorm und daher am Beginn intensiver Erforschung.

Autoimmune Erkrankungen

Das Immunsystem weist effiziente Mechanismen auf, um eine Immunität gegenüber den meisten Krankheitserregern zu vermitteln. Dennoch können als Folge der hohen BZR- und TZR-Diversität, welche die Diskriminierung eigener Antigene nicht ausschließt, unerwünschte Reaktionen gegen körpereigene Gewebe durch ein Fehlschlagen der Kontrollmechanismen auftreten. Dies ist meist mit der pathologischen Produktion von autoreaktiven Antikörpern, die eine Immunantwort gegen eigenes Gewebe vermitteln können, verbunden. Die Pathogenese solcher Autoimmunitäten ist trotz anhaltender Erforschung nicht ausreichend verstanden. Bisher wird ein multifaktorielles Geschehen vermutet, welches genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren einschließt und das Immunsystem in seiner Toleranz gegenüber körpereigener Moleküle stört. Als ein möglicher äußerer Faktor werden bestimmte Virusinfekte, die mit der Entstehung von Autoimmunitäten assoziiert zu sein scheinen, diskutiert. Eine andere grundlegende Ursache wird in der sogenannten Hygienehypothese angenommen. Diese erklärt die Überreaktion des Immunsystems durch die Abwesenheit der Stimulationen durch Parasiteninfektionen in westlichen Industrieländern (Bach, 2002; Christen et al., 2005; Kamradt et al., 2005).

Per Definitionen unterscheidet man systemische Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses oder rheumatoide Arthritis sowie organspezifische Autoimmunerkrankungen. Im Folgenden sollen jedoch ausschließlich die organspezifischen und die in dieser Arbeit thematisierten Autoimmunerkrankungen Multiple Sklerose und chronisch-entzündliche

Darmerkrankungen (CED) vorgestellt werden. Die Zuordnung der CED zu den Autoimmunitäten ist aufgrund der unbekannten Pathogenese Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Multiple Sklerose und das EAE-Mausmodell

Multiple Sklerose (MS) oder auch Encephalomyelitis disseminata ist eine autoimmune Erkrankung des zentralen Nervensystems. Primär wird sie durch autoreaktive Th1- und Th17-Zellen gegen Proteine der schützenden Myelinschicht von Nerven- und Gliazellen induziert. Als zelluläre Faktoren, die durch entzündungsfördernde Zytokine der antigenspezifischen Th1- und Th17-Zellen aktiviert werden und die destruierende Entzündung vermitteln, sind unter anderem CD8-positive T-Zellen, Autoantikörper produzierende B-Zellen oder Plasmazellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und Myelin-phagozytierende Makrophagen beschrieben worden (Sospedra et al., 2005). Einher geht diese Erkrankung mit verstreut-multiplen Entzündungsreaktionen im Nervensystem und der Demyelinisierung und der damit verbundenen Degeneration von Nervenzellen durch Makrophagen bzw. durch das Autoantikörper-aktivierte Komplementsystem (Piddlesden et al., 1993; Storch et al., 1998). Bezeichnend für diese Autoimmunerkrankung ist eine Sklerosierung von betroffenen, ehemaligen Entzündungsherden (Plaques) der weißen Substanz. Die Beschädigung von Nervenzellen führt in der pathologischen Entwicklung zu Störungen der Reizweiterleitung und resultiert in MS-typischen vielfältigen Symptomen, wie Lähmungserscheinungen, Spasmen oder auch Seh- und Gleichgewichtsstörungen. Diese Symptome können bereits in frühen Lebensjahren (20. bis 40. Lebensjahr) auftreten und betreffen weltweit mehr als eine Million Menschen. Trotz intensiver Erforschung sind die auslösenden Faktoren der Erkrankung bislang nicht identifiziert und zugrunde liegende Mechanismen nur unzureichend aufgedeckt. Vermutet wird, dass eine Kombination von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen die Krankheitsanlage meist vor dem 15. Lebensjahr manifestieren kann (Dean et al., 1971). Durchgeführte genomweite Kopplungsanalysen zur Analyse der genetischen Prädisposition identifizierten vor allem bestimmte Antigen-präsentierende MHC- bzw. HLA-Komplexe, β -Ketten von TZR, sowie Moleküle wichtiger Signalkaskaden, die mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert sind (Dyment et al., 2004a; Dyment et al., 2004b; Olerup et al., 1991). Viren und Bakterien gelten nach heutiger Sicht, zusätzlich neben bestimmter Lebens- und Ernährungsbedingungen, zu weiteren äußeren Faktoren, die eine MS-Erkrankung induzieren können. Zwar konnten bisher verschiedene Herpes- und Retroviren in den Läsionen von MS-Patienten gefunden werden, aber ein direkter Nachweis einer spezifischen Korrelation zwischen Infektion und Erkrankung gelang bisher nicht (Cepok et al., 2005; Coe et al., 2004; Gilden, 2005; Gran et al., 1999). Als potentielle Ursache wird in diesem Zusammenhang auch eine Kreuzaktivierung autoreaktiver T- und B-Zellen durch Herpes- oder Hepatitisvirus-Antigene, die myelinen Proteinen ähneln,

postuliert (Gran et al., 1999; Wucherpfennig et al., 1995). Als Antigene sind neben Glykolipiden (Shamshiev et al., 1999) vor allem Myelinproteine, wie MAG (*myelin associated glycoprotein*), MBP (*myelin basic protein*), MOBP (*myelin oligodendrocyte basic protein*), MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) und PLP (*proteolipid protein*), welche auch in MS-Mausmodellen zur Verwendung kommen, beschrieben.

Die experimentell induzierte autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein häufig genutztes Ratten- und Mausmodell zur Grundlagenerforschung der Multiplen Sklerose. Dieses kann zwar die komplexe Pathologie nicht wiedergeben, aber es weist dennoch im Bezug auf die Wirkungsweise autoreaktiver CD4-T-Zellen und Makrophagen sehr ähnliche Charakteristika auf (Gold et al., 2006; Lassmann, 2007). Ein weiterer Vorteil besteht in den unterschiedlichen Varianten dieses Tiermodells, wie der aktiven oder passiven EAE, die eine Betrachtung und Fragestellung aus verschiedenen immunpathologischen Aspekten erlaubt. Die Bezeichnung des aktiven EAE-Modells beschreibt eine direkte Immunisierung von Ratten oder Mäusen mit einem myelinischen Protein, so dass aktiv eine Immunantwort durch die Th1- oder Th17-Differenzierung gegen das injizierte Protein eingeleitet wird. Adjuvantien und Substanzen wie CFA, *M. tuberculosis* oder PTX, die bei der Immunisierung zusätzlich Verwendung finden, induzieren neben einer Th1-Antwort auch Zellen des angeborenen Immunsystems und erleichtern vermutlich autoreaktiven Th-Zellen den Blut-Hirn-Schrankeübertritt (Brabb et al., 1997; Linthicum et al., 1982). Unter einem passiven Modell versteht man hingegen eine EAE-Induktion ohne aktive Immunisierung. So erkrankten transgene Mäuse, welche T-Zellen mit Myelinprotein-spezifischen TZR tragen, spontan an EAE (Bettelli et al., 2006a; Krishnamoorthy et al., 2006; Lafaille et al., 1994; Waldner et al., 2000). Als weitere Variante des passiven Modells sei das Transfer-Modell erwähnt. Für dieses Modell werden zunächst *in vitro* neuroantigen-spezifische Th1- und/oder Th17-Zellen mit einem spezifischem Peptid oder Protein stimuliert und diese autoreaktiven Zellen anschließend in Empfängertiere injiziert. Im Vergleich zum aktiven Modell vollzieht sich der Krankheitsverlauf bei dieser Form rascher (Pettinelli et al., 1981; Wekerle et al., 1994). Allen Modellen gemein ist jedoch ein Krankheitsverlauf über mehrere Wochen, der mit Symptomen wie der Paralyse von Extremitäten (Diaparese) bis hin zur Tetraparese begleitet wird.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und das T-Zelltransfer Colitis-Mausmodell

Die entzündlichen idiopathischen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts werden als „chronisch-entzündliche Darmerkrankungen“ (CED) zusammengefasst und betrafen in den letzten Jahren mit steigender Prävalenz etwa 2,2 Millionen Menschen in Europa (Loftus, 2004). Auch bei dieser Erkrankung ist eine kausale Behandlung bislang nicht möglich, da die Ätiologie und Pathogenese der CED weitgehend unbekannt sind und aktuell erforscht werden.

Zu den beiden häufigsten CED zählen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). Während eine MC im Allgemeinen als autoimmune Erkrankung erachtet wird, ist die Zuordnung der CU zu den Autoimmunitäten aufgrund widersprüchlicher Daten bisher unklar. Aufgrund ihrer klinischen Manifestation lassen sich beide Formen der CED unterscheiden. Anders als bei einer MC-Erkrankung, bei der sich granulomatöse und transmurale Entzündungen diskontinuierlich entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts bilden können, ist bei einer CU eine kontinuierliche oberflächliche Entzündung, die sich lokal hauptsächlich auf die Epithelzellschicht und die Lamina propria (LP) der Mukosa des Kolons beschränkt, zu finden.

Als mögliche multifaktorielle Auslöser für CED werden genetische Prädisposition, häufig Mutationen im NOD2-Gen und exogene Faktoren und Umwelteinflüsse wie die Ernährung, die in Veränderungen der Darmmikroflora resultieren, vermutet. Eine gestörte mukosale Immuntoleranz gegenüber dieser Flora führt möglicherweise zur Initiation einer fehlgeleiteten Immunantwort, welche nicht oder nur unzureichend kontrolliert werden kann. Die Entstehung von Autoantikörpern gegen die RNA bestimmter Kolonzellen wird ebenfalls als Auslöser in Betracht gezogen (Abraham et al., 2009b; Andres et al., 1999; Shanahan et al., 2009; Strober et al., 2007). Die histologische Pathologie ist in beiden Formen durch die Invasion klassischer Entzündungszellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten, die aus dem Blut kommend, das Darmgewebe infiltrieren, charakterisiert. Unterschiede zeigen sich vor allem in den dominierenden T-Helferzellpopulationen, die entscheidend an der mukosalen Immunantwort beteiligt zu sein scheinen. Wohingegen die Entzündungsreaktionen bei einer CU vorwiegend von IL-4, IL-5 und IL-13 sezernierenden Th2-Zellen vermittelt wird (Fuss et al., 1996; Heller et al., 2005; Heller et al., 2002), sind in den Entzündungsherden von MC-Patienten oder in induzierten Colitis-Tiermodellen vorwiegend die Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-18 und IL-12 assoziiert (Fais et al., 1991; Fiocchi et al., 1984; Monteleone et al., 1997; Mullin et al., 1992). Neuere Befunde aus Untersuchungen anhand von Mausmodellen postulieren jedoch eine Schlüsselrolle von Bakterien-spezifischen Th17-Effektorzellen in der CED-Pathogenese (Elson et al., 2007), die nachfolgend in CED-Patienten durch den Nachweis massiver Th17-Infiltrationen bestätigt werden konnte. Das Zytokin IL-23 fördert die Erhaltung und Aktivierung von Th17-Zellen und scheint in diesem Zusammenhang von zentraler Bedeutung, da es die Th17-vermittelte Immunantwort und die Entzündungsreaktion im Darm verstärken kann (Ahern et al., 2010). Aktuelle Ergebnisse zeigen allerdings auch eine widersprüchliche, entgegengesetzt protektive Funktion der Th17-spezifischen Zytokine IL-17A, IL-21 und IL-22, die aber unzureichend untersucht ist und weiterer Erforschung bedarf (Abraham et al., 2009a; McGovern et al., 2007; Sarra et al., 2010). In den letzten Jahren etablierten sich zur Untersuchung der CED-Pathogenese und Therapieentwicklung viele Ratten- und Mausmodelle (Uhlir et al., 2009; Wirtz et al., 2007), die maßgeblich zu neuen Erkenntnissen beitrugen. Neben im Vergleich älteren

Modellen, die durch die Immunisierung mit Polymeren, wie Dextransulfat (DSS, *dextran sulfate sodium*) oder Haptenen wie 2, 4, 6-Trinitrobenzensulphonsäure (TNBS) und Oxazon Colitis induzieren, entwickeln sich viele transgene und gendefiziente Mausmodelle, die ein ähnlich heterogenes Krankheitsbild geprägt von Th1- oder Th2-Immunantworten wie im Menschen repräsentieren. Eine Möglichkeit zur Induktion von Colitis in Mäusen besteht in einem adoptiven Transfer von selektiven T-Zellpopulationen in lymphopene Empfängertiere. Diesen Tieren, meist RAG (*Recombination Activating Gene*)-defiziente oder SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*)-Mäuse, fehlen T- bzw. B-Zellen, was nach einem Zelltransfer die Neubesiedelung der Maus durch homöostatische Expansion der Spenderzellen ermöglicht (Min et al., 2005; Ostanin et al., 2009). Dies geht mit einer unregulierten Aktivierung von Zellen durch intestinale Antigene oder einer möglicherweise spontanen Th1-Differenzierung und dem Fehlen von Treg-Zellen einher und resultiert aus mechanistisch nicht bekannten Gründen in einer Colitis. Vermutlich ist diese Form jedoch von distinkten Bakterien der Darmflora abhängig, da keimfrei gehaltene Mäuse oder Mäuse mit reduzierter Bakterienlast keine Transfercolitis entwickeln können (Aranda et al., 1997; Powrie et al., 1997).

Grundsätzlich werden zwei Formen der Transfercolitis anhand der syngen und naiven Spenderzellen unterschieden. Zum einen werden FACS-gereinigte CD4⁺CD45RB^{hi} und zum anderen naive CD4⁺CD62L⁺ (auch CD4⁺CD44^{lo}) Zellfraktionen transferiert. Zusätzlich werden in einigen Studien, da eine supprimierende Funktion von Treg-Zellen in verschiedenen Transfercolitis-Modellen bekannt ist, CD25-positive Treg-Zellen ausgeschlossen und CD4⁺CD25⁻ Zellpopulationen transferiert (Fantini et al., 2006; Groux et al., 1997; Kjellev et al., 2006; Read et al., 2000). Nach bisherigen Erkenntnissen scheinen Treg-Zellen eine zentrale nicht-redundante Rolle in der Erhaltung und Regulation der intestinalen Homöostase einzunehmen, die von den Faktoren IL-10 und TGF- β abhängig ist (Izcue et al., 2009). Da auch einige gastrointestinale Wurmparasiten direkt Treg-Zellen induzieren können (Grainger et al., 2010; Maizels et al., 2003; Yazdanbakhsh et al., 2004), ist dieser immunsupprimierende Wirkungsmechanismus Bestandteil aktueller Thesen.

Immunmodulation durch Helminthen

Der Begriff Helminthen bezeichnet eine nicht näher verwandte Gruppe von Endoparasiten der Phyla Plathelminthen (Plattwürmer) und Nematoda (Rundwürmer), die aber grundsätzliche Charakteristika im Bezug auf ihre Infektionsimmunologie, Epidemiologie und Pathologie teilen. Neben den Trematoden (Saugwürmern) und Zestoden (Bandwürmer) der ersten Gruppe, stellen hauptsächlich parasitisch lebende Nematoden vor allem in den Entwicklungsländern eine gesundheitliche Bedrohung und einen erheblichen ökonomischen Schaden dar. Nach Schätzungen der WHO des Jahres 2005 zufolge sind etwa allein 1 Milliarde Menschen mit

Askariden (Spulwürmer) und 604- 795 Millionen Menschen mit Trichurien (Fadenwürmer) infiziert. Weitere 576- 740 Millionen Menschen weisen zudem Infektionen mit humanpathogenen Hakenwürmern auf, die ebenfalls dem Stamm der Nematoden zugehörig sind. Gastrointestinalen Wurmparasiten setzen sich im Verlauf der Infektion und dem Durchschreiten meist mehrerer Larvenstadien in der Mukosa des Dünndarms fest, wo sie sich durch Blutsaugen oder direkt von Nährstoffen aus dem Wirtsdarm ernähren können. Durch die fortwährende Eiproduktion der Weibchen und der Ausscheidung mit dem Kot kommt es meist zu andauernden Reinfektionen, die den Wirt über einen längeren Zeitraum schwächen und schädigen können. Stellt der Menschen den Endwirt dar, resultiert dies häufig in einer durch den Ernährungsmangel herbeigeführten Wachstumsverzögerung bei Kindern und einer Anämie. Durch das fehlende Verständnis der protektiven Effektormechanismen gegen Helminthen ist die Entwicklung effektiver Therapien jedoch erschwert und ein hochwirksamer Impfschutz bislang nicht gefunden worden.

Viele Helmintheninfektionen resultieren mit einzelnen Ausnahmen, wie dem Infektionsverlauf von *Trichuris muris* oder *Brugia malayi*, in einer starken Th2-Immunantwort mit erhöhtem IgE-Serumspiegel, einer Eosino- und Basophilie sowie einer mukosalen Mastozytose. Für eine Immuntherapie liegt vor allem in dieser Wurm-induzierten Immunantwort, die vermutlich aus einer langen Koevolution von Helminthen mit ihren Wirten hervorgegangen zu sein scheint, ein wissenschaftliches Interesse. Die Modulation und Induktion des Immunsystems durch Wurmparasiten kann in einer Milderung oder einem Schutz vor autoimmunen oder allergischen Erkrankungen resultieren. Die zunehmende Prävalenz dieser Erkrankungen ist in Ländern mit hohem Hygienestandard zu beobachten (Cooke, 2009; McKay, 2009; Rook, 2009; Weinstock et al., 2009). Zusammen mit diesen Erkenntnissen und der entgegengesetzten Beobachtung, dass eine Zunahme an Erkrankungen in Ländern der südlichen Hemisphäre mit endemisch hohen Parasiteninfektionsraten und schlechten sanitären Bedingungen sehr viel weniger stark ausgeprägt ist, wurde die sogenannte Hygienehypothese formuliert. Diese postuliert, dass Wurmparasiteninfektionen im frühen Kindesalter vor der späteren Entwicklung von Allergien, Asthma oder Autoimmunität schützen können (Bach, 2002; Braun-Fahrlander, 2002; Strachan, 1989; Strachan, 2000; Wills-Karp et al., 2001). In Industrieländern könnte es daher vermutlich im umgekehrten Fall – durch den weitaus weniger häufigen Kontakt zu gastrointestinalen Wurmparasiten und der damit verbundenen induzierten Typ-2-Immunantwort – zu einer Verschiebung der T-Helferzelldifferenzierung von Th2-Zellen hin zu hyperreaktiven Th1- oder Th17-Zellen kommen, die für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko verantwortlich sind. Die inverse Korrelation von Parasiteninfektionen und autoimmunen Erkrankungen vor dem Hintergrund der Hygienehypothese wird auch von Parasiten-infizierten MS-Patienten verdeutlicht. Infizierte Patienten weisen im Vergleich zu Nichtinfizierten weniger Rezidive und mildere Krankheitsverläufe auf (Correale et al., 2007). Zudem resultiert die Behandlung infizierter

Patienten mit Anthelminthika in einer erhöhten Anzahl von IFN- γ - und IL-12-produzierender Zellen, sowie in der Abnahme von regulatorischen T-Zellen (Correale et al., 2011).

Aus den dargestellten Aspekten und Gründen liegt folglich ein therapeutischer Ansatz zur Behandlung autoimmuner und allergischer Erkrankungen sowie chronischer Darmerkrankungen mit Wurmparasiten nahe. Die starke Induktion der Typ-2-Immunantwort könnte daher gezielt zur Unterdrückung dieser Erkrankungen und Verschiebung der meist autoreaktiven Th1- oder Th17-Zellen genutzt werden. Eine Verbesserung von entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen, wie der MS, der Typ1-Diabetes und dem allergischem Asthma durch Helmintheninfektionen konnte in einigen Tiermodellen bereits beobachtet werden (Dunne et al., 2005; van den Biggelaar et al., 2004; Wang et al., 2001; Wohlleben et al., 2004; Yazdanbakhsh et al., 2004). Im Zuge von entzündlichen Darmerkrankungen ist zudem eine Pilotstudie beschrieben, in der Morbus Crohn Patienten durch eine orale Verabreichung von *Trichuris-suis*-Eiern erfolgreich therapiert werden konnten (Summers et al., 2005). Die immunsupprimierende Wirkung dieser Endoparasiten und die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden und ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. Vermutet wird, dass neben anderen, nicht näher erforschten immunsupprimierenden Substanzen (Harnett et al., 2006; Maizels et al., 2001; Smith et al., 2005), ein unbekannter Faktor seine Funktion über die alternative Aktivierung von Makrophagen (Herbert et al., 2004; Taylor et al., 2006b) oder durch die DC-vermittelte Induktion von regulatorischen T-Zellen, wie es bereits für die Modulation allergischer Atemwegserkrankungen beschrieben ist (Taylor et al., 2006a; Wilson et al., 2005), erzielt. Die Zunahme immunregulatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β durch Helminthen ist bekannt und spricht daher ebenfalls für eine Induktion von Treg-Zellen (Elliott et al., 2007; Maizels et al., 2003; McKay, 2009).

Alternativ aktivierte Makrophagen (AAM) werden im Gegensatz zu der klassisch aktivierten Makrophagenvariante der Typ 1-Immunantwort durch die Zytokine IL-4 und IL-13 induziert und sind neben der Tumorgenese vor allem mit einer Reihe von Helmintheninfektionen assoziiert (Herbert et al., 2004; Siracusa et al., 2008; Van Ginderachter et al., 2006). Ein möglicher immunmodulierender Effekt durch Makrophagen könnte durch einen inhibierenden, direkten Zellkontakt (Huber et al., 2010; Loke et al., 2000; MacDonald et al., 1999) vermittelt werden. Obwohl eine schützende Rolle von IL-4 sowie von IL-13 während einer Helmintheninfektion bereits in Mausmodellen für Diabetes mellitus Typ1 und EAE bekannt ist (La Flamme et al., 2003; Sewell et al., 2003; Zacccone et al., 2003), konnte jedoch die IL-4-Zytokinexpression bisher keinem speziellen Zelltypen zugeordnet werden. Neben Th2-Zellen produzieren auch NKT-Zellen, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen IL-4 und könnten daher eine Quelle darstellen. Aktuelle Daten aus einem *Nippostrongylus-brasilensis*-Infektionsmodell

sprechen diese Rolle hauptsächlich basophilen Granulozyten in einer primären und Th2-Zellen in der sekundären Immunantwort gegen den Parasiten zu (van Panhuys et al., 2011).

Das *Nippostrongylus-brasiliensis*-Infektionsmodell

Der gastrointestinale Wurmparasit *N. brasiliensis* ist ein natürlich vorkommender Parasit, der seinen Lebenszyklus ohne Zwischenwirte vornehmlich in Ratten vollzieht (Haley, 1962; Ogilvie et al., 1971). Aufgrund seiner engen Verwandtschaft mit den humanpathogenen Filarien und Hakenwürmern wie *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale* finden *N. brasiliensis*-Larven zur Infektion von Versuchstieren häufig Verwendung und stellen daher ein gut etabliertes, an die Maus adaptiertes Infektionsmodell dar. Im Gegensatz zur Infektion von Ratten entwickelt sich in Mäusen jedoch nur eine eingeschränkte Anzahl an infektiösen Larven (Solomon et al., 1966). L₃-Larven stellen das dritte und infektiöse Larvenstadium dar, das sich *in vitro* kultivieren lässt und für die Infektion von Mäusen genutzt werden kann. Nach einer subkutanen Injektion wandern diese innerhalb von 24-36 h über die Blutgefäße in die Lunge ein, wo sie sich festsetzen und bis zum Tag 4-5 weiter entwickeln. Von dort aus gelangen die Larven über die Entwicklung zu einem weiteren Stadium durch Hochhusten und wieder Verschlucken in den Magendarmtrakt. Die Reifung der Larven zu adulten Würmern des Stadiums L₅ vollzieht sich letztendlich während der Passage des Magens zum Dünndarm, wo sie ab dem 5. Tag festgesetzt in der Mukosa zu finden sind. Dort kommt es durch zweigeschlechtliche Vermehrung zur Produktion von Eiern. Der Lebenszyklus des Wurms endet schließlich nach dem Schlupf und zweifacher Häutung zum infektiösen und freilebenden Larvenstadium (Haley, 1962). Eine Infektion von immunkompetenten Mäusen verläuft hingegen unabhängig des Mausstamms transient, so dass bis zum Tage 10-14 durch die entwickelte protektive Immunität keine Würmer mehr im Dünndarm nachweisbar sind. Diese Abstoßungsreaktion der adulten Würmer ist vermutlich nicht von der Anwesenheit eosinophiler Granulozyten und Mastzellen, aber von IL-13-, IL-4R α - und STAT6-vermittelten Signalen abhängig (Artis et al., 2004; Maizels et al., 2004; Urban et al., 1998; Voehringer et al., 2006). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind jedoch nicht ausreichend aufgedeckt und verstanden. Die Wanderung der Parasiten induziert im Infektionsverlauf, ähnlich anderer Wurminfektionen, neben lokaler Entzündungsreaktionen in der Lunge und dem Dünndarm, eine starke Typ-2-Immunantwort. Dies resultiert neben einem erhöhten IgE-Serumspiegel, in einer lokalen sowie systemischen Baso- und Eosinophilie. Im Zuge der Infektion ist zudem eine Th2-Differenzierung aus naiven Zellen, teilweise durch aktivierte dendritische Zellen, und ein starker Anstieg von Th2-Zellen mit zeitlichem Verzug bis zum Tag 10 festzustellen (Holland et al., 2000; Mohrs et al., 2001; Shinkai et al., 2002; Voehringer et al., 2004). Obwohl die Larven durch den gesamten Organismus wandern, beschränkt sich dieser Anstieg jedoch auf die

Lunge und Lungen- und Dünndarm-assoziierten Lymphknoten (mediastinale bzw. mesenterische LK). Durch die induzierte mukosale Mastozytose in der Lunge, die vermutlich auf ähnlichen immunologischen Mechanismen wie der Immunantwort gegen Allergenen beruht (Watkins et al., 1996), eignet sich dieses Infektionsmodell zudem dazu, neue Erkenntnisse in der Allergie- und Asthmaforschung zu erlangen.

Eine *N. brasiliensis*-Infektion von Versuchsmäusen gilt als Infektionsmodell, was mit einer sehr starken Typ-2-Immunantwort im Vergleich zur Infektion anderer gastrointestinalen Wurmparasiten einhergeht. Aus diesem Grund liegt es nahe, anhand dieser Wurminfektion autoreaktive Th-Zellen und damit autoimmune Erkrankungen durch die induzierte Typ-2-Immunantwort zu unterdrücken und den Mechanismus unter Laborbedingungen zu untersuchen. Dies soll zu einem besseren Verständnis für neue therapeutische Ansätze beitragen.

Vermutlich liegen einer Immunmodulation durch *N. brasiliensis* ähnliche Mechanismen über die Induktion von Tregs oder AAM, wie sie auch für andere Typ-2-Immunantworten induzierende Wurmparasiten beschrieben sind (Abb. 2), zugrunde. Ein weiterer postulierter Mechanismus, die Inhibition der proinflammatorischen T-Effektorzellen durch ihre Repolarisierung in protektive Th2-Zellen durch eine Typ-2-Immunantwort, wurde in der vorliegenden Arbeit im Kontext des *N. brasiliensis*-Modells untersucht.

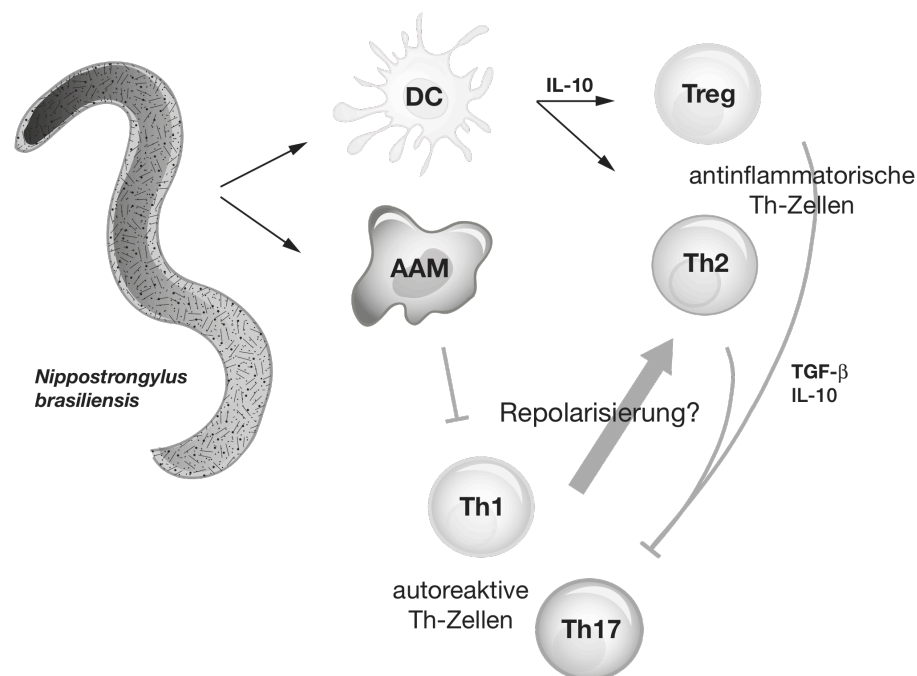


Abbildung 2. Modell immunmodulatorischer Mechanismen während einer *N. brasiliensis*-Infektion.

Eine Unterdrückung autoimmuner Erkrankungen könnte durch die Sekretion wurmspezifischer, bisher unbekannter Antigene induziert werden. Postuliert ist ein möglicher Effekt durch regulatorische T-Zellen (Treg) oder durch alternativ aktivierte Makrophagen (AAM), wie sie auch durch andere Parasiten induziert werden. Der Mechanismus einer möglichen Repolarisierung autoreaktiver T-Helferzellen des Typs 1 oder Typs 17 durch die Parasiten-vermittelte Typ-2-Immunantwort soll in dieser Arbeit untersucht werden. DC= Dendritische Zelle.

3 Fragestellung und Zielsetzung

Immunologische Fehlregulationen wie autoimmune und allergische Erkrankungen, sowie chronische Darmerkrankungen nehmen vermehrt in den letzten Jahrzehnten in Ländern mit hohem Hygienestandard zu. In Ländern der dritten Welt mit endemisch hoher Wurminfektionsrate treten Asthma oder Autoimmunitäten hingegen weitaus weniger häufig auf. Die aus den Beobachtungen abgeleitete Hygienehypothese deutet dies zum Teil durch das Fehlen immunsuppressiver Wurminfektionen in westlichen Ländern und einer Verschiebung der T-Helferzelldifferenzierung von Th2-Zellen hin zu autoreaktiven Th1- oder Th17-Zellen. Fehlende Reize des Immunsystems durch den sonst beständigen Kontakt zu gastrointestinalen Wurmparasiten und der damit verbundenen induzierten Typ-2-Immunantwort sind somit vermutlich für das Überschießen der Immunantwort und einer möglichen Autoimmunität oder einer allergischen Erkrankung verantwortlich.

Ein bereits zum Teil erfolgreich angewandter Therapieansatz zur Behandlung dieser Krankheitsbilder ist daher eine Verschiebung der unkontrollierten Immunreaktion hin zu einer protektiven Th2-Immunantwort durch gezielte Parasiteninfektionen. Diese immunsupprimierenden Eigenschaften von Wurmparasiten oder deren Eiern bei Allergien, Asthma und Autoimmunitäten konnte in bisherigen Untersuchungen gezeigt werden, jedoch sind die zu Grunde liegenden Mechanismen bisher weitgehend unbekannt und bedürfen intensiverer Forschung.

Ein möglicher supprimierender Mechanismus, nämlich eine Repolarisierung von autoreaktiven T-Helferzellen durch die Parasiten-induzierte Typ-2-Immunantwort, sollte daher zunächst grundlegend untersucht werden. Einige Studien des Differenzierungszustands von T-Helferzellen konnten diese Plastizität bislang nur vereinzelt unter *in vitro* Bedingungen zeigen, was die Situation in einem Organismus allerdings nicht ausreichend reflektiert. Infolgedessen sollte im Hinblick auf antigenspezifische Immuntherapien der Frage nachgegangen werden, ob *in vitro* oder *in vivo* ausdifferenzierte T-Effektorzellen in ihrer Differenzierung grundsätzlich flexibel sind und ein Maß an Plastizität in einem *N.-brasiliensis*-Mauszelltransfermodell *in vivo* aufweisen können. Dieses antigenspezifische Infektionsmodell galt es zunächst zu etablieren, um den postulierten Mechanismus bestätigen und definieren zu können. Parallel sollte mit einfachen Mausmodellen für Colitis oder Multiple Sklerose überprüft werden, ob eine T-Zellrepolarisierung ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus bei der Autoimmunmodulation durch Würmer ist und ob eine Infektion mit dem Wurmparasit *N. brasiliensis* diese autoimmunen Tiermodelle modulieren oder sogar vor der Entstehung der Erkrankung schützen kann.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Biologische Materialien

Mausstämme

BALB/c (Haplotyp H-2^d)

Mäuse dieses Wildtyp-Mausstamms wurden vorwiegend als Empfängertiere für adoptive T-Zelltransferexperimente genutzt. Ursprünglich wurde dieser Stamm von *The Jackson Laboratories* (Bar Harbour, ME, USA) bezogen und im Tierstall nachgezüchtet.

C57BL/6 (Haplotyp H-2^b)

Dieser Mausstamm wurde als Wildtypstamm verwendet. Diese Mauslinie wurde ursprünglich von *The Jackson Laboratories* (Bar Harbour, ME, USA) erworben.

DO11.10-4get-CD90.1 (BALB/c)

Diese Mauslinie wurde aus der Kreuzung von 4get-Reportermäusen mit transgenen DO11.10-CD90.1-Mäusen erstellt und diente als Donor-Mausstamm für die in dieser Arbeit gezeigten Repolarisierungsexperimente. Der DO11.10-Mausstamm ist transgen für einen T-Zell Rezeptor (TZR, Murphy et al., 1990), der einen Peptidabschnitt des Hühner-Ovalbumins OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) zusammen mit MHC-Rezeptoren der Klasse II I-A^b erkennt (Robertson et al., 2000). Der Nachweis von CD4-T-Zellen, die den Rezeptor an der Zelloberfläche tragen (nur etwa 25% aller CD4⁺ T-Zellen), erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper KJ1-26. Das Glykoprotein CD90.1 (Thy1.1) diente als kongener Marker zur Identifizierung jener Zellen in CD90.2-positiven Empfängermäusen. Wie beschrieben, enthalten 4get-Mäuse einen dem Interleukin-4-Gen nachgeschalteten, kodierenden Abschnitt für das verstärkte grün-fluoreszierende Protein (eGFP; Mohrs et al., 2001). Durch die eingefügte interne Ribosomeneintrittsstelle nach dem für IL-4 kodierenden Leserahmen wird eine bicistronische Transkription von IL-4 und eGFP gewährleistet. Während IL-4 posttranskriptionell sezerniert wird, verbleibt Letzteres nach der Translation innerhalb der Zelle und kann somit als direkter Marker für IL-4-produzierende Zellen dienen. Die zur Kreuzung verwendeten Mäuse wurden ursprünglich von R. Locksley (UC San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt.

CD4Crex4-13F/F

CD4-konditional IL4/IL-13-defiziente Mäuse wurden durch die Kreuzung von CD4Cre- (Taconic Farms, Germantown, USA) und 4-13F/F-Mäusen (Voehringer et al., 2009) in diesem Labor hergestellt. Die unter Kontrolle des CD4-Promoters exprimierte Cre-Rekombinase ermöglicht das gezielte Entfernen des durch loxP-Bereiche eingerahmten IL-13/IL-4-Genabschnitts.

IL-4^{-/-}/IL-13^{-/-} (BALB/c)

Mäuse dieses Stamms wurden durch Keimbahndeletion des IL-4-/IL-13-Gens hergestellt (McKenzie et al., 1999). Sie dienten als Empfängertiere für den Transfer von CD4-positiven T-Zellen. Zur Verfügung gestellt wurden die Mäuse von A. McKenzie (MRC, Cambridge, UK).

DEREG (BALB/c)

Zellen des BAC-transgenen Mausstamms DEREK (*depletion of regulatory T cells*) exprimieren Diphtheriatoxin-Rezeptoren und eGFP unter der Kontrolle des Foxp3-Promoters (Lahl et al., 2007). Dies ermöglicht neben der Verwendung dieser Mäuse als Foxp3eGFP Treg-Reporter, auch die optionale Depletion von Tregs durch die Zugabe Diphtheriatoxins in das Trinkwasser. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Mäuse jedoch lediglich als Reporterermäuse verwendet und dienten als Spender für den adoptiven T-Zelltransfer. Die Mäuse wurden von T. Sparwasser (MH, Hannover, GER) bereitgestellt.

2D2 (C57BL/6)

Mäuse der 2D2-Linie sind transgen für einen T-Zellrezeptor der spezifisch einen Peptid-Abschnitt des myelinen Oligodendrozyten-Glykoproteins (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*; MOG₃₅₋₅₅: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) auf Neuronen oder Gliazellen im Kontext von I-A^b MHC-Rezeptoren erkennt. Neben einer 30%igen Inzidenz an spontaner optischer Neuritis zu erkranken, zeigen Mäuse dieses Stammes nach Myelinpeptid-Immunisierung eine erhöhte Induktion an experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE; Bettelli et al., 2003). Die Expression des transgenen Rezeptors – bestehend aus einer V α 3.2- und einer V β 11-Kette – auf CD4⁺ T-Zellen wurde routinemäßig mit einem Anti-V β 11-Antikörper durchflusszytometrisch kontrolliert und nachgezogene Mäuse typisiert. Verwendet wurde dieser Mausstamm als Spender für adoptive T-Zelltransferexperimente zur Auslösung von EAE in Rag2^{-/-}-defizienten Mäusen (adoptive Transfer-EAE). Zur Verfügung gestellt wurden die Mäuse von H. Wekerle (MPI, München, GER).

2D2-Th (C57BL/6)

In die Mauslinie 2D2 wurde durch die Verpaarung mit Th-Mäusen (auch IgH^{MOG}) ein rekombinierter J_H-Lokus der IgH-Kette eingekreuzt. B-Zellen dieser *knock in*-Mäuse sekretieren

durch diesen Locus MOG-spezifische IgG-Autoantikörper und sind beschrieben (Litzenburger et al., 1998). Durch die Kreuzung beider Stämme wurden Mäuse hergestellt, die sowohl autoimmune B- als auch T-Zellen gegen das myeline Glykoprotein aufweisen und so die EAE-Pathogenese spontan induzieren. Innerhalb des ersten Lebensjahrs erkrankten etwa 40% dieser Mäuse durch die Autoimmunität gegen das MO-Glykoprotein auf Neuronen oder Gliazellen (Bettelli et al., 2006a; Krishnamoorthy et al., 2006). Verwendet wurden Mäuse dieser Linie, die ebenfalls von H. Wekerle (MPI, München, GER) bezogen wurden, als passives und spontan-induziertes EAE-Mausmodell. Die Typisierung erfolgte mit einem IgM^a-Antikörper mittels durchflusszytometrischer Analyse.

Rag2^{-/-} (C57BL/6 und BALB/c)

Rag2 (*recombination activating gene*) defiziente Mäuse beider Stämme wurden ursprünglich von *The Jackson Laboratories* (Bar Harbour, ME, USA) bezogen. In Mäusen dieser Stämme sind große Teile des RAG2-Leserahmens deletiert. Dies resultiert durch die zentrale Rolle des Enzyms in der V(D)J-Rekombination, in einer Störung der B- und T-Zellreifung (Shinkai et al., 1992). Mäuse der Linien wurden aufgrund ihrer Lymphopenie als Empfängertiere für das adoptive EAE-Transfermodell oder Colitis-Transfermodell verwendet. Das Fehlen von B- und T-Zellen in gezüchteten Nachkommen wurde durch eine durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut kontrolliert.

Rattenstämme

Für die Aufrechterhaltung des Lebenszyklus des Parasiten *Nippostrongylus brasiliensis* wurden ausschließlich Lewis-Ratten ab einem Alter von 8 Wochen für die Parasiteninfektion verwendet. Bezogen wurden die Tiere von Charles River (Wilmington, MA, USA).

Viren und virale Vektoren

MVA-OVA

Der nicht-replikative und Ovalbumin-kodierende, virale Impfvektor MVA (*modified vaccinia virus Ankara*), wurde von I. Drexler (GSF, München, GER) zur Verfügung gestellt und ist beschrieben (Gasteiger et al., 2007).

MCMV-ΔM94-OVA

Das rekombinante und ebenfalls replikationsdefiziente β-Herpesvirus MCMV-ΔM94-OVA (murines Cytomegalovirus; (Mohr et al., 2010)) wurde von U. Koszinowski (MVP, München, GER) zur Verfügung gestellt.

Bakterien

Das zur Vervollständigung des Freund-Adjuvans genutzte *Mycobacterium tuberculosis* wurde in hitzeinaktivierter Form von der Firma Difco (Detroit, USA) bezogen.

Parasiten

Die in dieser Arbeit verwendeten L₃-Larven des gastrointestinalen Parasiten *N. brasiliensis* wurden in diesem Labor gewonnen und kultiviert. Ursprünglich wurden infektiöse L₃-Larven von K. Erb (Boehringer Ingelheim, Ingelheim, GER) zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Puffer und Kulturmedien

Für die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen wurde dH₂O verwendet. Die hier aufgeführten Mengenangaben beziehen sich auf ein Volumen von einem Liter. Alle für die Zellkultur verwendeten selbst hergestellten Puffer wurden sterilfiltriert (Filtergröße 0,45µm).

Zellkulturmedien

DPBS	PanBiotech, Aidenbach, GER
IMDM	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, GER
RPMI 1640	PanBiotech, Aidenbach, GER

RPMI 1640 und IMDM wurden zusätzlich mit 10% FKS, 5x10⁻⁵M β-Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 10 µg/ml Streptomycin komplettiert.

Sonstige Puffer

FACS-Puffer	Dulbeccos PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; 2% FKS; 0,1% NaN ₃
FACS-Blutpuffer	Dulbeccos PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; 2% FKS; 0,1% NaN ₃ ; 2000 U/l Heparin
ACK-Puffer	8,29 g NH ₄ Cl; 1 g KHCO ₃ ; 37,2 mg Na ₂ EDTA; pH 7,2
SORT-Puffer	Dulbeccos PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; 4% FKS
MACS- Puffer oder Sekretions-/Detektionspuffer	Dulbeccos PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; 0,5% FKS; 2 mM EDTA
AB-Puffer (10x)	20 g Neomycinsulfat; 0,5 g Polymyxin-B-Sulfat
Tris-Puffer (0,1 M)	12,1 g Tris; pH 7,5
Fixierungs-Waschpuffer	Biolegend, Uithoorn, NL
DNA-Auftragspuffer (10x)	0,1 M EDTA; 0,5% Bromphenolblau; 0,5% Xylencyanolblau; 40% Saccharose; pH 8,0
Fixier- & Permeabilisierungspuffer	Biolegend, Uithoorn, NL

4.1.3 Antikörper

Primärantikörper (Anti-Maus)

Epitop	Konjugat	Isotyp	Klon	Zweck	Bezugsquelle
CD4	PB, PE/Cy5	R, IgG2a	RM4-5	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD8	PE, PerCP	H, IgG2a	53-6.7	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD16/32	---	R, IgG2b	2.4G2	DZ	Eigene Hybridomazellkultur
CD25	PE	R, IgG1	PC61.5	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD28	---	H, IgG	37.51	ZK	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD44	FITC, APC	R, IgG2b	IM7	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD45R	FITC	R, IgG2a	RA3-6B2	DZ, IH	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD62L	FITC, APC	R, IgG2a	MEL-14	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD90.1	PE, APC	M, IgG2a	HIS51	DZ, IH	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD90.2	PE, APC	R, IgG2	53-2.1	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
DO11.10	PE, APC	M, IgG2a	KJ1-26	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
Foxp3	PE	R, IgG2a	FJK-16s	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
eGFP	---	K, IgG	ab6556	IH	Abcam, Cambridge, UK
IFN- γ	PE	R, IgG1	XMG1.2	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
IFN- γ	---	R, IgG1	XMG1.2	ZK	BioXCell, Lebanon, NH, USA
IgM ^a	FITC	M, IgG1	DS-1	DZ	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IL-17	APC	R, IgG2a	eBio17B7	DZ	eBioscience, San Diego, CA, USA
IL-4	PE, A647	R, IgG1	11B11	DZ	Biolegend, San Diego, CA, USA
IL-4	---	R, IgG1	11B11	ZK	BioXCell, Lebanon, NH, USA
V β 11	FITC	R, IgG2	KT11	DZ	Caltag, Burlingame, CA, USA
β -TZR	---	H, IgG	H57-597	ZK	Biolegend, San Diego, CA, USA

R= Ratte, M= Maus, H= Hamster, K= Kaninchen, DZ=Durchflusszytometrie, IH= Immunhistologie, ZK= Zellkultur

Sekundärantikörper

Die Detektion von biotinylierten Primärantikörpern für die Durchflusszytometrie wurde mit Streptavidin (SA)-PE-Cy7 bzw. SA-FITC durchgeführt (eBioscience, San Diego, CA, USA). Für die Immunhistologiefärbung von Lymphknotenschnitten kam zudem ein biotinyliertes anti-Kaninchen Esel-F(ab')₂-Fragment von Jackson ImmunoResearch Labs. (Suffolk, UK) zur Verwendung.

4.1.4 Zytokine & Zellkulturzusätze

rh IL-2	ImmunoTools, Friesoythe, GER
rm IL-4	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

rm IL-6	Peprtech, Hamburg, GER
rm IL-12	ImmunoTools, Friesoythe, GER
rm IL-23	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rh TGF- β 1	Peprtech, Hamburg, GER
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, GER
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, GER

4.1.5 Proteine & Peptide

OVA ₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR)	Apara Bioscience, Denzlingen, GER
MOG ₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK)	Biotrend, Zürich, CH
BSA (Fraktion V \geq 98% biotinfrei)	Roth, Karlsruhe, GER
Hühner-Ovalbumin	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

4.1.6 Enzyme

Superscript® III- RT	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phusion-DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, FI
Taq-DNA-Polymerase	Genecraft, Köln, GER

4.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für die quantitative PCR wurden bei Metabion Martinsried, GER synthetisiert und mit dem Programm Oligo 6.8 konstruiert (Aktin- und IL-9-Oligonukleotide von PrimerBank).

Bezeichnung	Tm in °C	Sequenz (5' → 3')
β -Aktin1 (F)	51,4	ATGGATGACGATATCGCT
β -Aktin2 (R)	54,5	ATGAGGTAGTCTGTCAGGT
mpGata3F	66,7	TCTGGAGGAGGAACGCTAATG
mpGata3R	63,5	AAGGGAGAGATGTGGCTCAG
mpT-betF	62,6	CAGAACGCAGAGATCACTCAG
mpT-betR	65,0	TCCGCTTCATAACTGTGTTCC

IL-4F2	60,4	ACTTGAGAGAGATCATCGGCA
IL-4R2	60,5	AGCTCCATGAGAACACTAGAGTT
IL-9F2	60,9	AAGGATGATCCACCGTCAAATG
IL-9R2	61,0	ACCCGATGGAAAACAGGCAAG

F= Vorwärts (*forward*), R= Rückwärts (*reverse*)

4.1.8 Kommerzielle Kits

CD4 ⁺ T-Zellisolierungskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
IL-4, IL-17A und IFN- γ Sekretions/Detektionskit,	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
RNA-Isolationskit	Fluka, Buchs, CH
„RNeasy Mini“-Kit	Qiagen, Hilden, GER
„OneStep“ RT-PCR-Kit	Qiagen, Hilden, GER
DyNAmo™ Capillary-SYBR® Green qPCR-Kit	Finnzymes, Espoo, FI
PKH26 Färbekit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Foxp3/Treg-Färbekit	eBioscience, San Diego, CA, USA
Pro5® MHC I-SIINFEKL Pentamer	Prolimmune, Oxford, UK
TSA™ Flourescein System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
SA-/Biotin-Blockierungskit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

4.1.9 Chemikalien & Reagenzien

2-Propanol	Roth, Karlsruhe, GER
4',6'-Diamidino-2-phenylindol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Accudrop beads	BD, Heidelberg, GER
Agarose	Roth, Karlsruhe, GER
Azeton	Roth, Karlsruhe, GER
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe, GER
dNTPs	Roth, Karlsruhe, GER
Ethanol (techn.)	Roth, Karlsruhe, GER
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, GER
Ethylendiamintetraessigsäure	AppliChem, Darmstadt, GER
Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dithiothreitol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Gewebe-Einfriermedium	Jung, Nussloch, GER
Heparin	Biochrom AG, Berlin, GER
Kohlegranulat	Neolab, Heidelberg, GER

Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, GER
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, GER
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, GER
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, GER
Pertussistoxin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, GER
DNA-Größenstandard pBR328	Roth, Karlsruhe, GER
RNase AWAY®	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
Tris-Chlorid	Roth, Karlsruhe, GER
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid	Fluka, Buchs, CH

Alle weiteren Säuren und Laugen, organische Lösungsmittel, Feinchemikalien und Salze wurden falls nicht anderweitig gekennzeichnet von der Firma Roth (Karlsruhe, GER) bezogen. Die Herkunft nicht genannter Reagenzien und Lösungsmittel ist dem jeweiligen Methodenteil zu entnehmen.

Antibiotika

Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, GER
Polymyxin B-Sulfat	Roth, Karlsruhe, GER
Penicillin	Biochrom AG, Berlin, GER
Neomycinsulfat	Roth, Karlsruhe, GER

4.1.10 Gerätschaften

Arbeitssicherheitsbänke	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Osterode, GER
Durchflusszytometer	FACS Calibur, FACS Cantoll und FACS Aria; BD Biosciences, San José, CA, USA
Feinwaagen	Mettler PL1200; Mettler-Toledo, Greifensee, GER
Inkubatoren	Heraeus, Kendro Laboratory, Osterode, GER
Kryostat	CM1950; Leica Microsystems, Bensheim, GER
Pipetten/Multikanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, GER
Bestrahlungsanlage	Gammacell® 40; AECL, Ontario, CA
Magnet-Zellseparator	QuadroMACS™ Separator; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
Mikroskope	Laborlux O und SM-Lux; Leica, Wetzlar, GER Olympus BX41, Olympus, Hamburg, GER
Photometer	NanoDrop ND-1000; NanoDrop Inc., Wilmington, USA und Ultraspec3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, GER

PCR-Maschinen	LightCycler®; Roche Diagnostics, Mannheim, GER und Robocycler® Gradient 96; Stratagene Agilent Technologies, Cedar Creek, TX, USA
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, CH Cenco Instrumente, Breda, NL
Wasserbäder	GFL, Burgwedel, GER
Zentrifugen	5417C; Eppendorf, Hamburg, GER Mikro 200 und Rotanta 460R; Hettich, Tuttlingen, GER Superspeed RC-5B; ThermoScientific; Waltham, USA LC carousel 2.0; Roche, Mannheim, GER

4.1.11 Verbrauchsmaterialien

PCR-Röhrchen (0,2 ml)	Brand, Wertheim, GER
Reaktionsgefäße (1,5 ml, steril)	Starlab, Ahrensburg, GER
Falcon™-Röhrchen (15 und 50 ml)	BD Falcons, Franklin Lake, NJ, USA
1ml Omnican®-Spritzen	Braun, Melsungen, GER
Einwegspritzen (5 ml)	Braun, Melsungen, GER
Glaspipetten (5, 10 & 20 ml)	Roth, Karlsruhe, GER
Plastikpipetten (5, 10 & 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg, GER
6-/24-/ oder 96-Lochplatte (flach)	Sarstedt, Nürnberg, GER
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe, GER
Durchflusszytometerröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, GER
Microtainer/Serumröhrchen	BD Falcons, Franklin Lake, NJ, USA
Flaschenaufsatzfilter (d 0,22 µm)	Corning, Corning, NY, USA
Glas-Pasteurpipetten (150 mm)	Roth, Karlsruhe, GER
Neubauer Hämozytometer	Roth, Karlsruhe, GER
ImmEdge™ Pen	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Kanülen (0,45x12 mm)	Braun, Melsungen, GER
Kryo-Aufbewahrungsröhrchen	Roth, Karlsruhe, GER
LightCycler® Kapillaren (20 µl)	Roche, Mannheim, GER
MACS®-LS(+)-Trennsäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
Petrischalen (d 90 und 150 mm)	Roth, Karlsruhe bzw. Sarstedt, Nürnberg, GER
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg und Sarstedt, Nürnberg, GER
Gazetuch (d 0,40 und 0,70 µm)	VWR, Darmstadt, GER
SuperFrost Plus-Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
Zellschaber	Peske, Aindling-Amhofen, GER
Zellsiebe (d 0,70 µm)	BD Falcons, Franklin Lake, NJ, USA

4.1.12 Software und Internetservice

FlowJo v. 8.8.6	Treestar, Ashland, OR, USA
SigmaPlot® 2000	Systat Software Inc., San José, CA, USA
GraphPad Prism4	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Excel 2008	Microsoft, Redmond, WA, USA
Oligo 6.8	Molecular Biology Insights, Cascade, USA
BD FACS Diva™ 1.1.3	BD Bioscience, San José, CA, USA
Cell [^] F	Olympus, Tokio, JP
PrimerBank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
GeneDB	http://genedb.org

4.2 Methoden

4.2.1 Zell- und immunbiologische Methoden

4.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung von Mauszellen erfolgte in 5% CO₂-begasten Brutschränken bei 37°C und Wasser-gesättigter Atmosphäre. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, wobei ausschließlich sterile Lösungen und Verbrauchsmaterialien verwendet wurden.

4.2.1.2 *In vitro* Differenzierung von T-Zellsubpopulationen

Die *in vitro* Differenzierung von T-Effektorzellen wurde aus gemischten Milz-/Lymphknoten-Einzelzellsuspensionen erzielt, wobei in der Suspension enthaltene dendritische Zellen bei antigen-spezifischer Stimulation als präsentierende Zellen (APZ) dienten. Als Antigen für Zellen aus DO11.10-4get-CD90.1 und 2D2-Mäusen, fanden die entsprechenden Peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ 200 ng/ml bzw. MOG₃₅₋₅₅ 20 µg/ml Verwendung. Für die Kultivierung von Th1, Th2 und iTreg-Zellen wurde komplettiertes RPMI 1640, für Th17-Zellen IMDM verwendet und jeweils 2x10⁶ Zellen/ml/Napf auf einer 24-Lochplatte ausplattiert. Die Kultivierungsdauer betrug insgesamt 5 Tage. An den Tagen 3 und 4 wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und jeweils durch frisches Medium mit enthaltenem IL-2 (20 ng/ml, ausnehmend Th17-Kulturen) ersetzt. Die

Herstellung von polyklonalen oder langzeit-stimulierten T-Zellpopulationen erfolgte analog. Für polyklonale T-Zellpopulationen wurden die Zellen jedoch durch Quervernetzung mit anti- β -TZR und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Über Nacht wurden dafür Zellkulturplatten mit den Antikörpern in PBS (0,5 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml) beschichtet und diese für die 5-tägige Kultivierung, nach kurzem Wegwaschen nicht gebundener Antikörper mit PBS, verwendet. Erfolgte eine mehrfache Polarisierung der Zellen über drei Wochen wurden die Zellen an Tag 6 und 12 jeweils geerntet, mit frischem Medium gewaschen und mit bestrahlten BALB/c-Splenozyten (3000 rad) als APZ erneut ausplattiert. Folgende Kulturkonditionen bzw. Zytokin- und Antikörperkonzentrationen wurden für die Polarisierung der T-Zellen verwendet:

Th1: rhIL-2 (20 ng/ml), rIL-12 (20 μ g/ml), anti-IL-4 (20 μ g/ml)

Th2: rhIL-2 (20 ng/ml), rIL-4 (20 ng/ml), anti-IFN- γ (20 μ g/ml)

Th17: rIL-6 (20 ng/ml), rhTGF- β -1 (5 ng/ml), anti-IL-4 (20 μ g/ml) und anti-IFN- γ , (20 μ g/ml)

iTreg: rhIL-2 (20 ng/ml), rhTGF- β -1 (15 ng/ml), anti-IL-4 (20 μ g/ml) und anti-IFN- γ (20 μ g/ml)

4.2.1.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden Mausorgane, die in 10 ml des jeweiligen Mediums vorlagen, mittels der gummierten Rückseite eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (d 70 μ m) gestrichen. Lungenmaterial wurde zuvor mit einer Schere zerkleinert, um residente Zellen aus dem Gewebe vollständig lösen zu können. Zur Abtrennung von Zelldebris und verbliebenem Gewebe wurde die Zellsuspension anschließend in ein 15 ml Falcon™-Röhrchen überführt und bei 300 g/4°C in einer Zentrifuge für 5 min sedimentiert. Im Anschluss wurde zur Entfernung noch enthaltener Erythrozyten, das Zellpellet in ACK-Puffer gelöst und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde darauf durch Zugabe von 10 ml kaltem Zellkulturmedium oder FACS-Puffer gestoppt und die Zellen erneut unter gleichen Bedingungen pelletiert. Die resuspendierten Zellen wurden abschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.1.4 Zellgewinnung aus dem peripheren Blut

Venöses Blut wurde wie unter 4.2.4.6 beschrieben entnommen und Blutzellen bei 300 g/4°C für 5 min mittels Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet durch leichtes Schütteln gelöst. Die Entfernung der Erythrozyten erfolgte wie zuvor beschrieben mittels ACK-Lyse.

4.2.1.5 Zellzahlbestimmung

Die Zelldichte von Suspensionen wurde durch Auszählung eines 10 µl Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer („Neubauer *improved*“, Tiefe 0,1 mm) ermittelt. Um durch Vitalfärbung tote Zelle auszuschließen, wurde das Aliquot vor der Auszählung 10-fach mit Trypanblau-Lösung verdünnt. Routinemäßig wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro ml unter Berücksichtigung der Verdünnung hochgerechnet.

4.2.1.6 PKH26-Zelloberflächenfärbung zur Analyse der Zellproliferationsrate

Die Färbung von T-Zellen mit dem lipophilen Farbstoff PKH26 wurde gemäß den Angaben des Herstellers Sigma-Aldrich nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Serum-freiem Medium durchgeführt. Für eine ausreichende Fluoreszenzintensität während der durchflusszytometrischen Analyse wurden 15 µl der fertigen PKH26-Lösung zu 8×10^7 Zellen in 1 ml Lösung C gegeben. Die Inkubationszeit in der sich das Fluorochrom an die Doppellipidschicht der Zellen anlagert und integriert betrug 3 min. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von purem FKS gestoppt, 1 min inkubiert und mit komplettiertem RPMI-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach dem Sedimentieren durch Zentrifugation (5 min/300 g/4°C) und zweimaligen Waschen der Zellen mit PBS, standen die Zellen für adoptive Transferexperimente zur Verfügung. Die Analyse der Zellproliferation erfolgte nach erneuter Isolierung aus der Maus an einem FACS Gerät.

4.2.1.7 Zelloberflächenmarkierung für die durchflusszytometrische Analyse

Für die Oberflächenmarkierung von Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen an Fc-Rezeptoren durch eine 5-minütige Inkubation mit anti-CD16/32-Antikörpern blockiert. Pro Färbeansatz wurden dafür etwa 10^6 Zellen in 100 µl FACS-Puffer vorgelegt und mit 2 µl der anti-CD16/32-Antikörper (0,38 mg/ml) durch leichtes Schütteln vermischt. Anschließend wurden 100 µl der eigentlichen, vorverdünnten Antikörperlösung zugegeben, kurz gemischt und erneut für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Überschüssige nicht gebundene Antikörper wurden daraufhin durch Waschen mit FACS-Puffer und einem Zentrifugationsschritt (5 min/300 g/4°C) entfernt. Wurden Biotin-gekoppelte Antikörper verwendet, erfolgte ein zweiter Färbeschritt nach dem selbem Schema mit Streptavidin. Zur Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen in einem finalen Volumen von etwa 200 µl, abhängig von der Zelldichte, in FACS-Puffer resuspendiert und durch ein Gazestück (d 70 µm) gefiltert, um etwaig enthaltene Zelldebris zu entfernen. Die Lagerung von Antikörper-markierten Zellen erfolgte bis zur Verwendung auf Eis und im Dunkeln, um eine vorzeitige Degradation der Fluorochrome zu verhindern.

Die verwendeten Antikörper sind unter 4.1.3 gelistet. Die notwendige Verdünnung und optimale

Konzentration des jeweiligen Antikörpers wurde in Vorversuchen anhand der Färbung von Milzzellen individuell ermittelt.

4.2.1.8 Färbung antigen-spezifischer Zellen durch Pentamerfärbung

Epitopspezifische T-Zellen können anhand ihres T-Zellrezeptors (TZR) mittels Anfärbung mit einem Fluorochrom-konjugierten MHC/Peptid-Komplex detektiert und durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Durch die Multimerisierung mehrerer MHC-Komplexe (Pentamere) und deren Bindung an mehreren TZR-Molekülen über die spezifischen Peptide kann eine zusätzliche Amplifikation des Signals erzielt werden (Altman et al., 1996). Für den Nachweis OVA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach MVA/OVA-Infektion wurde das Anti-MHCI PE-konjugierte SIINFEKL-Pentamer (H-2K^b) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Für eine ausreichend intensive Färbung der Zellen während der durchflusszytometrischen Analyse, wurden 3 µl der fertigen Pentamerlösung auf 10⁶ Zellen in 100 µl FACS-Puffer eingesetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach kurzem Waschen in FACS-Puffer zur Entfernung überschüssiger Pentamere und sedimentieren durch Zentrifugation (300 g/5 min/4°C), wurde das Sediment in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, 8 µl der fertigen Pro5 Fluorotag-R-PE-Lösung hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden.

4.2.1.9 Intrazelluläre Färbung

Die Färbung von intrazellulären Antigenen ist - abhängig vom Antigen selbst, der Antigen-Konzentration und Lokalisierung - meist nur durch die vorherige Stimulation der Zellsyntheserate und intrazellulären Antigen-Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (ER) möglich. Um dies zu erzielen wurden Zellen zuvor in entsprechendem Medium für 4 h mit PMA (40 ng/ml) und Ionomycin (2 µg/ml) bei 37°C in einem Inkubator stimuliert. Nach 1-stündiger Inkubation wurde Brefeldin-A (10 µg/ml) hinzugegeben. Nach insgesamt 4-stündiger Stimulation wurden die Zellen zunächst einer Oberflächenmarkierung (4.2.1.7) unterzogen und im Anschluss durch Aufnahme des Zellpellets in 500 µl Fixier-/Permeabilisierungspuffer bei 4°C im Dunkeln fixiert und permeabilisiert. Die Fixierung und Permeabilisierung wurde nach 30 min durch Zugabe von 1,5 ml Fixierungs-Waschpuffer gestoppt, die Reaktionsröhrchen kurz zum Mischen invertiert und die Zellen sedimentiert (7 min/490 g/4°C). Die darauffolgende 30-minütige Inkubation mit Antikörpern für die intrazelluläre Färbung, erfolgte wie alle Waschschrte und die Verdünnung der Antikörper in Fixierungs-Waschpuffer. Nach erneuter Zentrifugation (7 min/490 g/4°C) wurden nicht gebundene Antikörper durch zwei Waschschrte mit je 1 ml Fixierungs-Waschpuffer entfernt und die Zellen final in etwa 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Aufgrund der permeabilisierten und somit instabilen Zellmembran wurde

während des gesamten Protokolls auf ein Vortexen der Proben verzichtet und stattdessen das Pellet durch leichtes Schütteln resuspendiert.

Die Färbung des nuklear lokalisierten Transkriptionsfaktors Foxp3 wurde laut Herstellerangaben mit Hilfe des Foxp3/Treg-Färbekits der Firma eBioscience durchgeführt. Nach Färbung von Oberflächenmarkern wie zuvor beschrieben, wurden die Zellen in Fixierungs-/Permeabilisierungspuffer aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Permeabilisierungspuffer, Sedimentation durch Zentrifugation (7 min/500 g/4°C) wurde das Zellsediment in 100 µl Anti-Foxp3-PE Antikörper-Lösung aufgenommen und erneut für 30 min inkubiert. Entsprechend des ersten Waschschriffs wurde die Antikörperlösung gegen Permeabilisierungspuffer ersetzt und die Zellen nach nochmaligem Waschen schließlich in FACS-Puffer resuspendiert.

4.2.1.10 Detektion und Sekretionsnachweis der Zytokine IL-4, IL-17A und IFN- γ

Der Nachweis von Zellen mit einer spezifischen Zytokinproduktion wurde neben der intrazellulären Färbung anhand kommerziell erhältlicher Sekretions-/Detektionskit der Firma Miltenyi Biotec entsprechend der Herstellerangaben erzielt. Die Verwendung zweier konjugierter Antikörpern, die zum einen auf der Zelloberfläche (CD45) und zum anderen das sezernierte, freie Zytokin binden und eines Fluorochrom-konjugierten Antikörpers gegen das spezifisch-gebundene Zytokin, ermöglichen die Visualisierung Zytokin-sekretierender, lebender Zellen in einem Durchflusszytometer. Zunächst wurden für die Induktion der Zytokinproduktion $2,5 \times 10^6$ Milz- oder Lymphknotenzellen/ml/Ansatz für 4 h mit PMA (40 ng/ml) und Ionomycin (2 µg/ml) in komplettiertem RPMI oder IMDM stimuliert. Nach einem Waschschriff mit Medium und Sedimentieren der Zellen durch Zentrifugation (5 min/300 g/4°C), erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Zellen mit den dimeren Antikörpern, wobei 5 µl der gebrauchsfertigen Antikörper-Lösung pro Ansatz verwendet wurden. Die Zytokinsekretion wurde anschließend durch Zugabe von 50 ml 37°C-warmem Kulturmedium induziert und die Zellen in einem 37°C Wasserbad- währenddessen der auf der Zelloberfläche gebundene Antikörper sezerniertes Zytokin bindet- für 45 min inkubiert. Falsch positiv markierte Zellen, Zellen die Zytokine der Nachbarzelle binden, wurden durch eine ausreichend geringe Zelldichte (5×10^5 Zellen/ml) und durch ständiges Mischen des Ansatzes während dieser Sekretionsphase verhindert. Die Detektion des gebundenen Zytokins wurde nach einem anschließenden Waschschriff mit kaltem Sekretions-/Detektionspuffer und der Inkubation mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper (5 µl/ 2×10^6 Zellen) auf Eis erzielt. Nach dem Entfernen von überschüssigen freien Antikörpern durch erneutes Waschen, konnten die markierten Zellen in einem Durchflusszytometer final analysiert oder optional mittels FACS sortiert werden.

Grundsätzlich wurden unstimulierte Zellen (Inkubation ohne PMA/Ionomycin) vergleichend analysiert, um ein etwaiges Auftreten falsch positiver Zellen festzustellen.

4.2.1.11 Zellisolation mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS)

Der Transfer von T-Zellpopulationen in Empfänger-mäuse setzt eine hohe Zellreinheit voraus, um Sekundäreffekte durch kontaminierende Zellen möglichst auszuschließen. Aufgrund dessen wurden hochreine T-Zellpopulationen (>98% Reinheit) aus Einzelzellsuspensionen von Milz, Lymphknoten oder aus *in vitro* Kulturen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) angereichert. Nach der intrazellulären Markierung von Zytokinen (4.2.1.9) oder Oberflächenmarkern (4.2.1.7) durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper, wurden die Zellen in SORT-Puffer resuspendiert und durch sterile Siebfilter filtriert. Die Sortierung wurde an einem BD FACS Aria gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt. Um eine ausreichend hohe Vitalität der sortierten Zellen aufrecht zu erhalten wurden die Zellen direkt in Medium mit 40% FKS sortiert. Galt es Zellen für eine semi-quantitative PCR zu isolieren, wurden Zellen direkt in 21,5 µl mit ddH₂O verdünnten 5xPuffer des „OneStep“ RT-PCR-Kits sortiert.

4.2.1.12 Zellisolation mittels magnetischer Zellseparation (MACS)

Die Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus Einzellsuspensionen wurde durch eine magnetische Zellseparation (MACS) erzielt. Zur Verwendung kam dabei ein kommerziell erhältliches Kit und der Magnet-Separator der Firma Miltenyi Biotec. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben ausnehmend der verwendeten Antikörperkonzentrationen. 2×10^7 Zellen pro Ansatz wurden in MACS-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation (5 min/300 g/4°C) pelletiert und in 80 µl des Biotin-gekoppelten Antikörpergemischs aufgenommen. Die enthaltenen Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD8a, CD45R, CD49b, CD11b und Ter-119 binden während dieser Inkubation an dendritischen Zellen, B-Zellen, Erythrozyten und Granulozyten und können in einem weiteren Inkubationsschritt nach erneutem Waschen durch Streptavidin (150 µl/ 2×10^7 Zellen) erkannt werden. Durch die Konjugation dieses Reagenz mit paramagnetischen Mikrokügelchen ist es möglich die markierten Zelltypen in einer LS(+)-Trennsäule, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet, zurück zuhalten, während die unmarkierte CD4-T-Zellfraktion passieren kann (negative Selektion). Die Reinheit des gewonnenen Eluats wurde routinemäßig im Durchflusszytometer kontrolliert. Eine Reinheit von >95% wurde als ausreichend erachtet und die Zellen für weitere Versuche verwendet.

4.2.1.13 Gewinnung von Mausseren

Die Blutentnahme aus Mäusen erfolgte wie unter 4.2.4.6 beschrieben. Für die Serengewinnung wurde das Blut in ein Microtainer/Serum-Röhrchen überführt und durch das enthaltene Separationsgel und anschließender Zentrifugation (5 min/5000 g/RT) Erythrozyten abgetrennt. Das obenauf liegende Serum wurde abgenommen, in ein Eppendorfröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.1.14 Herstellung von Gewebsschnitten und Immunohistologie

Die Fixierung von trachealen und mediastinalen Lymphknoten wurde direkt nach Entnahme aus der Maus durch Überführung in Paraformaldehyd-Lösung (4%) gestartet und die Organe in der Lösung über Nacht bei 4°C gelagert und weiter fixiert. Am Folgetag wurde die Lösung gegen PBS ausgetauscht und die enthaltenen Organe kurz gewaschen und anschließend trocken getupft. Die Lymphknoten wurden schließlich in Einfriermedium (Tissue-Tek) eingebettet und durch langsames Eintauchen in flüssigen Stickstoff gleichmäßig durchgefroren, um Luftblasen innerhalb des Gelbetts zu verhindern. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

Einen Tag vor der Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden 5 µm dünne Gewebsschnitte an einem Kryostaten angefertigt und auf Objektträger überführt. Nach mindestens 1-stündiger Trocknung an der Raumluft wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet, damit aufgetragene Antikörper- oder Blockierlösungen direkt auf dem Schnitt verbleiben. Anschließend wurden freie Peroxidasen und Bindestellen von Fc-Rezeptoren durch ein kurzes Bad der Schnitte in 1%iger Wasserstoffperoxid-Lösung bzw. einer anschließenden 30-minütigen Inkubation mit den anti-CD16/32 Antikörpern in PBS (0,38 mg/ml) und enthaltenem Maus- und Rattenserum (je 2%) zerstört und blockiert.

Des Weiteren wurde endogenes Biotin mittels eines Biotin/Streptavidin-Blockierungskits nach Herstellerangaben zur Vermeidung eines hohen Hintergrundsignals maskiert. Für die Färbung IL-4/eGFP-produzierender Transferzellen in den mediastinalen Lymphknoten von Empfängermausen wurden die Gewebsschnitte mit polyklonalen anti-eGFP Kaninchen-Antikörpern (2,5 µg/ml) in TNB-Puffer und zusätzlich enthaltenem Maus- bzw. Rattenserum (je 2%) für 1 h inkubiert. Nach dem Abnehmen der Lösung und Waschen mit PBS wurde der biotinylierte anti-Kaninchen Esel-Sekundärantikörper (finale Konz. 0,4 µg/ml in TNB-Puffer) aufgetropft und für weitere 30 min inkubiert. Die Detektion und Amplifikation dieses Antikörpers wurde durch die Verwendung eines Streptavidin-HRP/FITC-Tyramidin-Systems aus einem TSA Fluorescein-Kit gemäß den Herstellerangaben erzielt. Nach einer 25-minütigen Inkubation mit Streptavidin-HRP in TNB-Puffer ohne Serum, wurde das Signal durch anschließende Inkubation (max. 8 min) mit FITC-gekoppeltem Tyramid amplifiziert. Zusätzlich zur Färbung von IL-4eGFP-positiven Zellen wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen CD90.1 (0,5 µg/ml) und CD45R (B220) (2 µg/ml) gegengefärbt, um transferierte Spenderzellen bzw. die B-Zellzone im Lymphknoten zu identifizieren. Nach abschließender Inkubation der Schnitte in einer DAPI-Lösung für 10 min zur Darstellung der Zellkerne, wurden die Gewebsschnitte mit Fluoromount G-Gel und Deckgläschen eingedeckt. Die mikroskopische Analyse erfolgte an einem Olympus BX41-Mikroskop mit UplanSApo Objektiv und der Software cell[^]F.

4.2.2 Parasitologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung des Parasiten *Nippostrongylus brasiliensis*

Der natürlich vorkommende Rattenparasit *N. brasiliensis* kann seinen Entwicklungszyklus in Mäusen vermutlich durch die induzierte Immunantwort nicht vollständig abschließen, so dass nur etwa 15% der Larven in ein infektiöses Larvenstadium differenzieren (Solomon et al., 1966). Aus diesem Grund wurden für die Gewinnung freilebender, infektiöser L₃-Larven für die Infektion von Mäusen, Ratten in einem sich wiederholenden 6-10-wöchigen Zyklus mit dem Parasiten infiziert. Dafür wurden 2500 L₃-Larven in 1 ml NaCl-Lsg (0,9%) subkutan in eine Hautfalte nahe der Schwanzbasis injiziert und 450 ml des Trinkwassers mit 50 ml 10x AB-Puffer versetzt, um bakterielle Sekundärinfektionen auszuschließen. Ab Tag 7 post Infektion wurden die Ratten auf Laufgitter gesetzt und der Kot mit darin enthaltenden Parasiteneiern über die darauffolgenden 3 Tage gesammelt. Die täglich anfallende Kotmenge wurde in PBS aufgeschlemmt und zu etwa gleichen Teilen mit Kohlegranulat versetzt. Das entstandene Gemisch wurde in kleinen Haufen auf mit feuchtem Filterpapier ausgelegten Petrischalen (150 mm) verteilt und die Petrischalen in einer feuchten Kammer bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln bei RT gelagert. Die Entwicklung der L₃-Larven vollzieht sich in 8-12 Tagen, so dass nach diesem Zeitraum Larven für die Infektion von Mäusen zur Verfügung standen.

4.2.2.2 Auszählung des Wurmparasiten aus dem Darm immunisierter Mäuse

Für die Kontrolle der Wurmabstoßung wurde der Dünndarm *N.-brasiliensis*-infizierter Mäuse an Tag 10 post infektionen entnommen und in eine vorbereitete Petrischale mit Kulturmedium überführt. Nach der Eröffnung des Darms mit einem Längsschnitt wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Lebende adulte Würmer (Stadium L₃) wurden unter einem Binokular gezählt.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1987) unter Verwendung von Taq- oder Phusion-Polymerase nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Die Reaktionen wurden in einem Robocycler® PCR-Gerät mit entsprechenden Primern und in der Regel mit 35 Zyklen durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur wurde individuell für jedes Oligonukleotidpaar ermittelt. Die Konstruktion neuer Primer erfolgte mit Hilfe des Programms Oligo 6.8.

4.2.3.2 RNA-Isolierung und reverse Transkription aus sortierten Zellpopulationen

Die quantitative Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren Gata-3 und T-bet wurde mittels qPCR durchgeführt. Für dies wurde zuvor RNA aus FACS-sortierten Zellen (4.2.1.11), die in 21,5 µl 5xPuffer in dH₂O des „OneStep“ RT-PCR-Kits vorlagen, isoliert. Nach kurzem Aufschließen der Zellen durch Vortexen und wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff bzw. einem 37°C Wasserbad, wurde die RNA gemäß den Herstellerangaben in cDNA revers transkribiert. Zur Verwendung kamen die in Abschnitt 4.1.7 gelisteten Oligonukleotide, welche die jeweilige mRNA spezifisch binden und der reversen Transkriptase als Matritze dienen. Die RT-Reaktion wurde bei einer Temperatur von 50°C für 30 min durchgeführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 70°C zur Inaktivierung der RT, wurde der cDNA-Ansatz anstatt für eine Standard-PCR für eine qPCR genutzt und zu gleichen Teilen mit SYBR®Green gemischt.

4.2.3.3 RNA-Isolierung und reverse Transkription aus mesenterischen Lymphknoten

RNA aus mesenterischen Lymphknotenzellen wurde nach dem Herstellen von Einzelsuspensionen (4.2.1.3) unter Verwendung des Fluka RNA-Isolationskits gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Reverse Transkription wurde ausgehend von 2 µg isolierter RNA mittels Superscript III Reverser Transkriptase und mit oligo(dT)₂₀ Oligonukleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer Test-PCR mit β-Aktin-Oligonukleotiden (4.1.7 und 4.2.3.1) wurde die cDNA für eine semiquantitative PCR verwendet.

4.2.3.4 Semiquantitative PCR

Für die quantitative PCR-Analyse (qPCR) von gesorteten T-Zellpopulationen wurden 10 µl des cDNA/PCR-Ansatzes (4.2.3.2) mit 10 µl Mastermix des DyNAmo™Capillary SYBR®Green-qPCR-Kits gemischt, in die entsprechenden Glaskapillaren überführt und das Gemisch an den Grund der Kapillaren zentrifugiert (30 s/735 g/RT). Für die Analyse der Zytokin-mRNA von IL-9 und IL-4 aus mesenterischen Lymphknotenzellen wurden 100 ng der cDNA, sowie 0,5 µM der entsprechenden Oligonukleotide eingesetzt und ebenfalls der SYBR®Green-qPCR-Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die qPCR erfolgte in einem LightCycler: Nach einer 3-minütigen initialen Denaturierung bei 94°C, wurden 40 Wiederholungen folgenden Zyklus gefahren: 94°C/30 s, 56°C/30 s und 72°C/60s. Nach einer 10-minütigen finalen Elongation bei 72°C wurde eine Schmelzkurvenanalyse mit einem Temperaturgradienten von 65-94°C durchgeführt. Die Normierung der erhobenen Daten erfolgte im Vergleich zu dem Haushaltsgen β-Aktin ($2^{(CP_{\beta act} - CP_{Gen})}$). CP, *crossing point*.

4.2.4 Tierexperimentelle Methoden

4.2.4.1 Allgemeine Handhabung von Mäusen

Alle Versuchstiere wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie in München unter Einhaltung geltender Tierschutzgesetze in einem Einzel-ventilierten Käfigsystem (IVC)-Ständer spezifisch pathogenfrei gehalten. Für durchgeführte Experimente wurden ausschließlich gleichgeschlechtliche Mäuse ab einem Alter von 6-12 Wochen verwendet. Trinkwasser und Nahrung wurden *ad libitum* angeboten.

4.2.4.2 Intravenöse und intranasale Applikation von Substanzen

Für die intravenöse Injektion von Substanzen in die laterale Schwanzvene wurden Mäuse zuvor zur Vasodilatation unter einer Wärmelampe für 2 min erwärmt. Bei der Applikation von Substanzen wurde ein Volumen von über 200 µl pro Maus nicht überschritten. Die intranasale Gabe von Ovalbumin erfolgte unter einer leichten Sedierung. Dafür wurden Mäuse kurzzeitig mit Isofluran begast und der Maus in Rückenlage 50 µl einer Ovalbumin-Lösung (10 mg/ml) auf ein Nasenloch getropft. Durch die Überstreckung des Kopfes wurde gewährleistet, dass das Proteingemisch durch die Atmung selbständig in die Lunge gezogen wurde.

4.2.4.3 Infektion mit rekombinanten Viren

MVA-OVA

Der rekombinante, OVA kodierenden Impfvektor MVA-OVA (Gasteiger et al., 2007) wurde durch I. Drexler in einer Konzentration von 2×10^8 pfu/ml bereitgestellt. Zur Infektion von Mäusen wurde der Ansatz mit PBS verdünnt, das Gemisch für 20 s in einem Ultraschallbad zur besseren Suspension sonifiziert und schließlich Mäusen intravenös appliziert (1×10^7 pfu/Maus).

MCMV-ΔM94-OVA

Das rekombinante β-Herpesvirus MCMV-ΔM94-OVA (murines Cytomegalovirus) wurde von U. Koszinowski (MVP, München, GER) zur Verfügung gestellt. Neben der Deletion des Proteins M94, was die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle *in vivo* verhindert, exprimiert das Virus zusätzlich das Protein Ovalbumin (Mohr et al., 2010). Den Mäusen wurden 10^5 bzw. 10^6 pfu in PBS intravenös verabreicht.

4.2.4.4 Infektion mit dem Parasiten *Nippostrongylus brasiliensis*

Für die Infektion von Mäusen mit dem Parasiten *N. brasiliensis* wurden die unter 4.2.2.1 beschriebenen Kulturen mit 10 ml 37°C warmer NaCl-Lösung (0,9%) gespült und die L₃-Larven in einen mit dünnem Gewebetuch ausgelegten Trichter einer Baermann-Apparatur (Baermann,

1917) überführt. Nach 1-stündiger Inkubation wurden lebende Larven- die sich durch das Gewebe fressen und sich im unteren Teil des Schlauchs ansammeln- abgelassen. Im Anschluss erfolgten drei Waschschriffe durch das Absinken lassen der Larven, Verwerfen des Überstands und Aufnahme der Larven in 20 ml frischer und 37°C-warmer NaCl-Lösung. Die gereinigten Larven wurden final in einer Konzentration von 2500 Larven/ml suspendiert und Mäusen 200 µl der Lösung subkutan an der Schwanzbasis appliziert.

Optional wurde der Lösung Hühner-Ovalbumin (500 µg/ml) hinzugefügt und das Wurm/Protein-Gemisch für 30 min inkubiert und erst anschließend appliziert (100 µg OVA/Maus). Nach erfolgter Infektion wurde das Trinkwasser mit 50 ml Antibiotika-Puffer (10x AB-Puffer) angereichert, um bakterielle Sekundärinfektionen auszuschließen.

4.2.4.5 Adoptiver Transfer von T-Zellen in Empfängerermäuse

Der Transfer von MACS- oder FACS-gereinigten T-Zellpopulationen erfolgte stets in gleichgeschlechtliche und syngene Empfängertiere, um etwaige Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Für die Untersuchung von *in vitro* hergestellten T-Zellpopulationen wurden hochreine Zellen (mind. $\geq 98\%$) mit PBS zweimalig durch Aufnehmen in Puffer und Sedimentierung durch Zentrifugation (5 min/300 g/4°C) gewaschen. Falls nicht anderweitig deklariert wurden routinemäßig 5×10^5 Zellen in 200 µl PBS pro Empfängermaus i.v. appliziert. *Ex vivo* isolierte Zellen wurden analog und wenn nicht anderweitig vermerkt 5×10^4 Zellen/Maus in CD90.1-kongene Empfängerermäuse transferiert. Die durchflusszytometrische Detektion der Spenderzellen in BALB/c- oder IL-4-IL-13-defizienten Mäusen erfolgte durch Färbung des kongenen Markers CD90.1 (Thy1.1) bzw. durch direkte Anfärbung OVA-spezifischer Zellen mit dem KJ1-26-Antikörper.

4.2.4.6 Organentnahme

Für Organentnahmen wurde Mäuse durch zervikale Dislokation oder CO₂-Begasung getötet. Die Lage von Organen bzw. Lymphknoten kann der Literatur entnommen werden (Cook, 1956; Van den Broeck et al., 2006).

Venöses Blut

Für die Entnahme von venösem Blut wurde zur Vasodilatation der lateralen Schwanzvene die Maus kurzzeitig einer Wärmelampe ausgesetzt. Die Vene wurde einseitig mit einem Skalpell angeritzt und etwa 50-100 µl des Bluts in Heparin-haltigem FACS-Blutpuffer aufgefangen und auf Eis verwahrt. Wurden größere Mengen an venösem Blut für die Serengewinnung benötigt, erfolgte die Blutentnahme aus dem Herz einer kurz zuvor getöteten Maus. Der rechte Ventrikel wurde dafür mit einer 1 ml Omnicar[®]-Spritze punktiert und das Blut entnommen.

Entnahme von Lymphknoten und der Milz

Zur Entnahme der Milz und einzelner Lymphknoten wurde die tote Maus mit Hilfe einer Schere entlang der Bauchseite aufgeschnitten ohne die Unterhaut zu verletzen. Die abdominale Bauchdecke wurde mit einer Pinzette angehoben und die Bauchhöhle mittels eines Medianschnitts eröffnet. Die links dorsal liegende Milz konnte im Anschluss mit Schere und Pinzette präpariert werden. Die Entnahme der mesenterischen Lymphknoten erfolgte nach Auslagerung der Darmschlingen und Streckung der Mesenterien. Für die Präparation der trachealen und mediastinalen Lymphknoten wurden unter Schonung des Thymus zuerst beide Lungenflügel entfernt. Zervikale und axillare Lymphknoten wurden lediglich von umschließendem Gewebe befreit und wie alle Organe in 10 ml RPMI, IMDM oder PBS auf Eis bis zum Gebrauch gelagert.

Entnahme der Lunge

Der Brustkorb der Maus wurde mit einer sterilen Schere eröffnet, das Mediastinum gelöst und die untere Hohlvene (*V. cava inferior*) durchtrennt. Enthaltenes tracheales Blut wurde im Anschluss per Punktion des rechten Ventrikels mit 5 ml PBS aus der Lunge gespült. Beide Lungenflügel wurden mit einer Schere entfernt und in 10 ml Zellkulturmedium auf Eis bis zur Verwendung gelagert.

4.2.4.7 Induktion und Beurteilung experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis

Spontanes EAE-Modell

Für die spontane induzierte EAE-Pathogenese (passives Modell) wurden Mäuse der 2D2/Th-Linie, die sowohl autoimmune B- als auch T-Zellen gegen das myeline Glykoprotein aufweisen, verwendet und gezüchtet. Innerhalb des ersten Lebensjahrs erkrankten etwa 40% dieser Mäuse durch die Autoimmunität gegen das MO-Glykoproteins auf Neuronen oder Gliazellen (Bettelli et al., 2006a; Krishnamoorthy et al., 2006). Routinemäßig wurden daher Mäuse der Linie täglich auf die spontane Erkrankung hin untersucht und das Körpergewicht erfasst. Die klinische Beurteilung von EAE erfolgte nach folgenden Kriterien: 0= keine Erkrankung; 1= geschwächter Schwanztonus; 2= Bewegungseinschränkungen der hinteren Gliedmaßen oder Paralyse; 3= vollständige Paralyse der hinteren Extremitäten (Diaparese); 4= Tetraparese; 5= moribunder Status.

Aktives EAE-Modell

Die aktive Induktion von EAE wurde durch Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit dem Neuroantigen MOG₃₅₋₅₅ erzielt. Dafür wurden zunächst 100 µl des vollständigen Freund-Adjuvans mit zusätzlichen 5 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*, das die Stimulation der

angeborenen Immunantwort induziert, mit Mörser und Pistill vermischt. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung mit 100 µl MOG₃₅₋₅₅-Peptid (2 mg/ml) in zwei miteinander verbundenen Plastik-Einmalspritzen (Luer-Lock-Anschluss, 5 ml) durch hin und her drücken der Stempel emulgiert. Nach kurzer Inkubationsphase (30 min/4°C) und anschließendem Test der Emulsion auf ihre Stabilität, wurden je 100 µl s.c. in den Nacken und an die Schwanzwurzel der Maus injiziert. An den Tagen 0 und 2 wurden der Maus zusätzlich 200 ng Pertussistoxin (PTX) in 200 µl PBS i.p. appliziert. Die Wirkung von PTX ist nur unzureichend untersucht, erleichtert aber vermutlich zum einen den Übergang autoreaktiver Th-Zellen über die Blut-Hirnschranke und zum anderen senkt es die Toleranz gegenüber dieser (Brabb et al., 1997; Linthicum et al., 1982). Immunisierte Mäuse entwickelten 8-14 Tage später EAE. Die Klassifizierung der klinischen Symptome wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Adoptives Transfer-EAE-Modell

Durch den Transfer neuroantigen-spezifischer *in vitro* aktivierter CD4-T-Zellen in naive Empfängermäuse kann eine autoimmune Enzephalomyelitis experimentell induziert werden (Pettinelli et al., 1981). Für die *in vitro* Herstellung wurden zunächst 2×10^6 /ml Splenozyten von 2D2-Th-Mäusen in RPMI 1640 Medium unter neutralen Zellkulturbedingungen (ausschließlich 20 ng/ml IL-2) mit 20 µg/ml MOG₃₅₋₅₅ polarisiert und aktiviert. Nach einer Inkubationsdauer von 5 Tagen wurden die Zellen geerntet, ein Aliquot durchflusszytometrisch auf die Expression von IL-17 und IFN-γ (4.2.1.9) hin untersucht und in PBS zweimalig, zum Entfernen des enthaltenen Serums und Farbstoffs im Medium, gewaschen. Final wurden $5-10 \times 10^6$ encephalitogene Zellen in 200 µl PBS in lymphopenische Rag2^{-/-}-Mäuse intravenös appliziert. Die Auswertung der EAE-Induktion erfolgte analog zu den zuvor beschriebenen Modellen.

4.2.4.8 Induktion von Colitis durch CD4-T-Zelltransfer

Ausgelöst wird die Entzündung im Kolon durch den Transfer von naiven CD4⁺ Zellen in lymphopenische Empfängermäuse und deren rasche homeostatische Expansion und IFN-γ-Produktion. Für die Induktion von Colitis in Rag2^{-/-}-Mäusen wurden zunächst aus resuspendierten Splenozyten von BALB/c oder 4get/Thy1.1-Mäusen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch negative Selektion mittels MACS (4.2.1.12) separiert. Nach durchflusszytometrischer Analyse der Reinheit (≥95%) und Umpuffern in PBS wurden 10^5 Zellen in einem Volumen von 200 µl pro Maus i.v. appliziert. Das Körpergewicht der behandelten Mäuse wurde täglich erfasst. Mäuse mit hohem Gewichtsverlust (<25% des initialen Körpergewichts) wurden aus dem Experiment genommen.

4.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte nach Students ungepaartem T-Test mit dem Programm Prism4. *P*-Werte kleiner als 0,05 bis 0,01 wurden als statistisch signifikant betrachtet und sind mit einem „*“ gekennzeichnet. Die weitere Einteilung der Signifikanzen stellt sich wie folgt dar: ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. Mittelwerte, Standardfehler (SE) und die Standardabweichung (SD) wurden mit den Programmen SigmaPlot® 2000, Prism4 oder Microsoft Excel ermittelt.

5 Ergebnisse

Das *Nippostrongylus-brasiliensis*/Ovalbumin-Infektionsmodell

Der Infektionsverlauf des Helminthen *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) resultiert im Mausorganismus in einer starken Typ-2-Immunantwort und stellt aus diesem Grund ein gut adaptiertes und etabliertes Infektionsmodell in der immunologischen Grundlagenforschung dar. Während der transienten Infektion, in der die Larven in ihrer Entwicklung über die Lunge final in den Darm wandern, werden hauptsächlich IL-4 produzierende Th2-Zellen sowie eosinophile und basophile Granulozyten ausschließlich in den betroffenen Organen und assoziierten Lymphknoten induziert (Voehringer et al., 2004). Diese starke parasiteninduzierte Zunahme von IL-4 positiven Th2-Zellen in der Lunge und den mediastinalen Lymphknoten (mLK) wurde aus diesem Grund in dieser Arbeit genutzt, um unter dem Gesichtspunkt einer möglichen Therapieentwicklung zur Klärung der Frage beizutragen, ob die bisher gefundenen Hinweise zur Plastizität ausdifferenzierter CD4-positiver T-Effektorzellen *in vitro* auch eine reale *in vivo* Situation reflektieren. Verschieden ausdifferenzierte T-Helferzellsubtypen wurden daher im Kontext der Parasiteninfektion und der damit begleitenden Th2-Immunantwort auf eine mögliche Repolarisierung hin zu IL-4 produzierenden Zellen *in vivo* untersucht.

Eine Induktion von experimentell leicht zugänglichen Th2-Populationen durch den Wurmparasiten und deren Beteiligung an der Parasitenbekämpfung ist einleitend durch einen Vergleich Nb-infizierter sowie naiver CD4^{Cre}x4-13^{F/F}- und Wildtypmäusen verdeutlicht (Abb. 3A/B). Konditional IL-4/IL-13-defiziente Mäuse weisen in ihren CD4-positiven (CD4⁺) Zellen durch die Cre-Rekombinaseaktivität keinen intakten IL4/IL-13-Lokus mehr auf und sind daher nicht in der Lage, beide Zytokine durch ihre CD4⁺ T-Zellen zu exprimieren. Anhand einer intrazellulären Zytokinfärbung und anschließender FACS-Analyse von PMA/Ionomycin-stimulierten, mLK-Zellen 10 Tage nach der Parasiteninfektion, ist eine starke signifikante Zunahme der IL-4-Expressionsfrequenz von CD4-positiven T-Zellen in Cre-Rekombinase negativen Wildtypmäusen zu beobachten. Analog zu naiven nicht-infizierten Mäusen wiesen infizierte CD4^{Cre}x4-13^{F/F}-Mäuse hingegen keine IL-4 positiven Th2-Zellen auf. Das Fehlen der Th2-Zellen und damit die Vermittlung der Parasiten-gerichteten Immunantwort korreliert zudem mit der Anzahl adulter Würmer im Dünndarm an Tag 10 nach der Infektion. Im Gegensatz zu Wildtypmäusen, die eine protektive Immunantwort durch IL-4-sezernierende Th2-Zellen induzieren können und folglich nur noch eine sehr geringe Anzahl adulter Würmer im Dünndarm aufweisen, konnte in CD4^{Cre}x4-13^{F/F}-Mäusen vergleichbar zu IL-4/IL-13-defizienten KO-Mäusen (413ko) eine hohe Anzahl von Wurmparasiten gezählt werden (Abb. 3B).

Neben einer erhöhten Frequenz an IL-4 produzierenden Th2-Zellen in den Lymphknoten ist jedoch keine Induktion weiterer Th-Zellsubtypen durch den Parasiten zu beobachten. Eine signifikante Zunahme der Th1- oder Th17-Zellfrequenz, wie mittels der intrazellulären Färbung der Markerzytokine IFN- γ und IL-17 gezeigt ist, konnte während des transienten Infektionsverlaufs nicht festgestellt werden (Abb. 3B). Ebenso scheint eine Beteiligung und Induktion von Th9-Zellen – eine spekulative vermeintlich neue IL-9 exprimierende CD4⁺ T-Zellpopulation deren Existenz und Rolle in der Helminthenimmunabwehr kontrovers diskutiert ist – aufgrund des geringen IL-9-Transkriptionslevel zumindest in der frühen Primärantwort gegen den Helminthen ausgeschlossen (Abb. 3C). Eine semiquantitative PCR-Analyse von

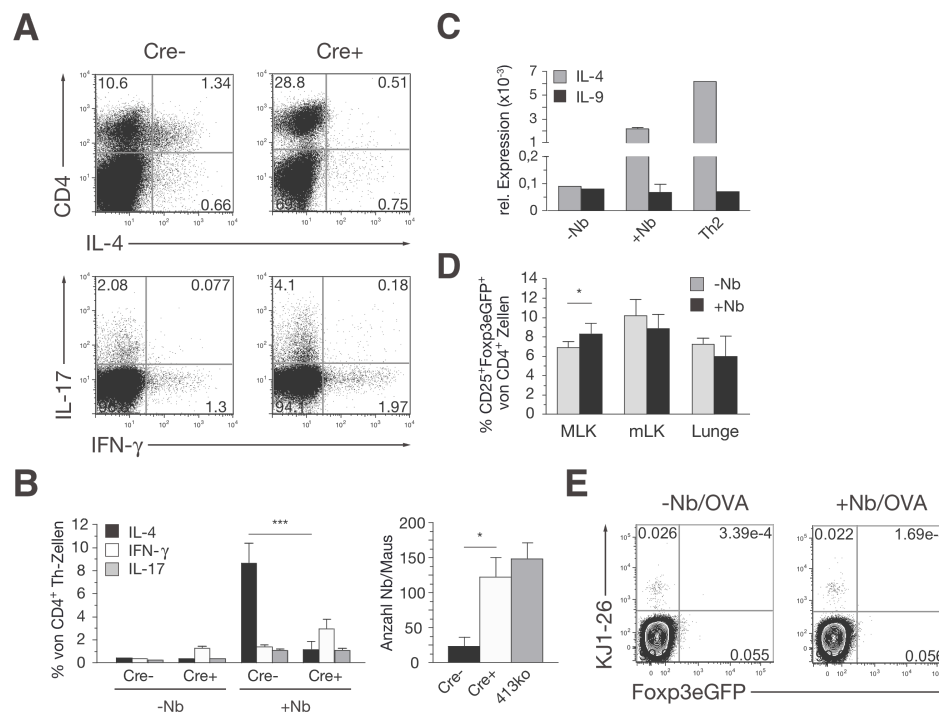


Abbildung 3. Der Parasit *Nippostrongylus brasiliensis* induziert eine protektive Th2-Polarisierung.

Wildtyp (CD4Cre⁻x4-13^{F/F}) oder CD4-konditional IL-4/IL-13-defiziente Mäuse (CD4Cre⁺x4-13^{F/F}) wurden mit 500 L₃-Larven des Parasiten *N. brasiliensis* (Nb) infiziert und CD4-positive Zellen der mediastinalen Lymphknoten (mLN) 10 Tage post Infektion durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die Wolkendiagramme zeigen die intrazelluläre Zytokin-Expressionsanalyse in infizierten Wildtyp (Cre-) und IL-4/IL13-defizienten Mäusen (Cre+). (B, links) Graphische Zusammenfassung der Frequenz von IL-4, IFN- γ und IL-17 exprimierenden Zellen innerhalb CD4⁺ T-Zellen ($P < 0,0001$). Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung (+SD) von mind. 4 Mäuse pro Gruppe bzw. 1-3 Mäuse innerhalb der Kontrollgruppe. (B, rechts) Anzahl adulter Würmer im Darm von Wildtyp- (Cre-), IL-4/IL-13-defizienten (Cre+), sowie IL-4/IL-13ko-Mäusen. $n = 4$ Mäuse/Gr. aus zwei unabhängigen Experimenten ($P < 0,0107$). (C) Semiquantitative PCR-Analyse der IL-9 bzw. IL-4 Transkripte von mesenterischen Lymphknotenzellen (MLN) aus unbehandelten und Nb-infizierten BALB/C-Mäusen bzw. von *in vitro* differenzierten Th2-Zellen. Gezeigt ist die relative Expression zur β -Aktin Transkription; $n = 3$ bzw. 1 für die Kontrollgruppen. (D) Mittlere Frequenz (+SD) von regulatorischen T-Zellen innerhalb CD4⁺ Zellen in den angegebenen Organen von DREG-Mäusen 10 Tage nach Nb-Infektion ($n = 2-4$ /Gruppe; $P = 0,0163$). (E) Exemplarische Wolkendiagramme zeigen lebende CD4⁺ T-Zellen im MLK nach dem adoptivem Transfer von je 1×10^6 CD4⁺KJ1-Foxp3eGFP⁺ T-Zellen pro BALB/c-Maus und 10 Tage nach Nb/OVA-Infektion sowie intranasaler OVA Gabe. Der als -Nb gekennzeichnete Graph zeigt vergleichend ein Empfängertier, dass ausschließlich eine intranasale OVA-Gabe an Tag 4 post Transfer erhalten hat.

mesenterischen Lymphknotenzellen ergab ein gleichbleibend niedriges IL-9-Expressionslevel. Zusätzlich konnte in diesen Lymphknoten erneut die Induktion von Th2-Zellen anhand des hohen IL-4-Expressionslevel bestätigt werden. Parallel wurden auch *in vitro* differenzierte Th2-Zellen überprüft und ein zu *ex vivo* Th2-Zellen etwa 3-fach höheres IL-4-Level beobachtet.

Regulatorische T-Zellen (Treg) stellen eine weitere CD4⁺ T-Zellpopulation dar und werden aufgrund ihrer regulatorischen Funktion neben anderen Zelltypen hinter den immunsupprimierenden Eigenschaften von Helmintheninfektionen vermutet. Die direkte Induktion dieser T-Zellpopulation konnte bereits durch einige Helminthen (Grainger et al., 2010; Maizels et al., 2003; Yazdanbakhsh et al., 2004) jedoch nicht für *Nippostrongylus brasiliensis* in Säugern beschrieben werden und wurde daher durch eine Infektion von Treg-Reportermäusen (DEREG-Mäuse) in dieser Arbeit untersucht. DEREG-Mäuse weisen ein dem Markerttranskriptionsfaktor Foxp3 nachgeschaltetes eGFP-Gen (grün-fluoreszierendes Protein) auf und erlauben damit den direkten Nachweis von grün-fluoreszierenden Foxp3⁺ Treg-Zellen im Durchflusszytometer. Eine Infektion dieser Mäuse mit dem Wurmparasiten resultierte lediglich in einer leichten signifikanten Zunahme der Treg-Frequenz an Tag 10 im MLK, aber nicht in der Lunge oder den mLK (Abb. 3D). Ob diese Zunahme der Treg-Frequenz das Ergebnis einer Rekrutierung der Zellen in den Lymphknoten oder einer *de novo* Bildung ausgehend von naiven Vorläuferzellen ist, wurde darüber hinaus mit Hilfe eines adoptiven Transfers antigenspezifischer Treg-Reporterzellen in Empfängerermäuse und anschließender Nb-Infektion untersucht. Dafür wurden zunächst die zuvor beschriebenen Treg-Reportermäuse mit T-Zellrezeptor transgenen DO11.10-Mäusen verpaart, deren CD4⁺ T-Zellen ein Peptid des Ovalbumins (OVA) im MHC-Klasse II Molekül I-A^d erkennen. Aus der Milz dieser Mäuse wurden mittels einer FACS-Sortierung antigenspezifische Zellen (CD4⁺KJ1-26⁺Foxp3eGFP⁻), die zwar das eGFP-Gen tragen, aber zu diesem Zeitpunkt nicht den Transkriptionsfaktor für Treg-Zellen Foxp3 exprimieren, isoliert und in BALB/c-Empfängerermäuse transferiert. Am Folgetag wurden die Mäuse mit Nb-Larven und OVA zur Antigenprovokation subkutan infiziert und an Tag 10 transferierte DO11.10-Zellen im MLK durchflusszytometrisch mit dem Antikörper KJ1-26 identifiziert und auf ihre Foxp3 Expression hin analysiert. Weder eine Expansion der spezifischen Zellen noch das Auftreten Grün fluoreszierender und folglich Foxp3-exprimierender Zellen wurde beobachtet (Abb. 3E). Aufgrund dieses Ergebnisses liegt vermutlich eine Rekrutierung der Zellen in die mesenterischen Lymphknoten anstatt einer *de novo* Entstehung ausgehend von den transferierten KJ1-26⁺ Vorläuferzellen nahe.

Zusammenfassend kann durch eine primäre Infektion mit dem Helminthen *Nippostrongylus brasiliensis* in Mäusen, neben einer Rekrutierung von Treg-Zellen in den MLK, keine weitere Induktion von Th-Subtypen wie Treg-, Th1-, Th17- oder Th9-Zellen beobachtet werden. Die starke und alleinige Polarisierung von Th2-Zellen innerhalb der verschiedenen Helferzellpopulationen durch den Helminthen stellt daher ein ideales Modell dar und erlaubt

deswegen eine gezielte Untersuchung der T-Zellpolarisierung in Richtung des Helferzelltyps.

In Kombination mit dem vorgestellten antigenspezifischen Parasitenmodell fanden aufgrund der eindeutigen Charakterisierung von Th2-Zellen anhand ihrer IL-4-Expression ebenso IL-4-Reportermäuse des Stammes „4get“ Verwendung. Diese Mäuse ermöglichen eine Detektion von IL-4-produzierenden Zellen durch ein dem IL-4-Gen bicistronisch nachgeschaltetem eGFP-Gen. Entgegengesetzt zum Zytokin, das ungehindert translatiert und anschließend sezerniert werden kann, verbleibt eGFP im Cytoplasma und kann direkt durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Fluoreszenz positiver Zellen reflektiert somit eine anhaltende Transkription des IL-4-Gens und korreliert mit der Menge an sekretiertem IL-4 (Mohrs et al., 2001). Dies erlaubt mit zusätzlichen, spezifischen Th-Zelloberflächenmarkern eine

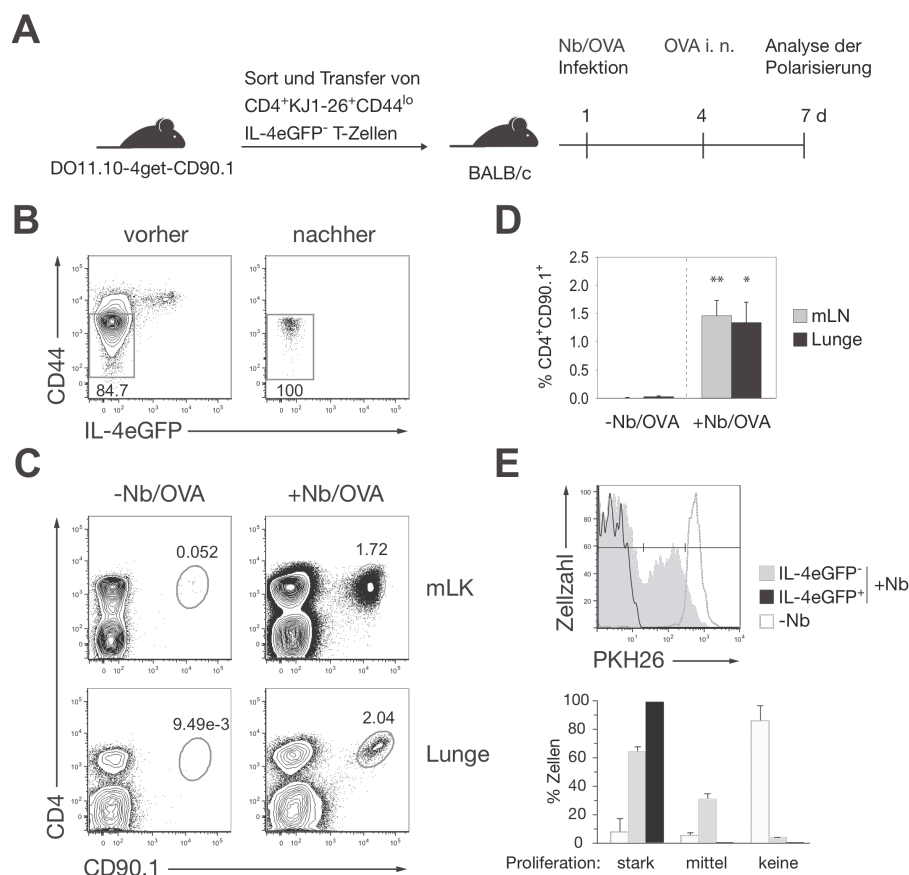


Abbildung 4. Expansion naiver OVA-spezifischer T-Helferzellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion. Ex vivo isolierte, naive Th-Zellen ($CD4^{+}KJ1-26^{+}CD44^{lo}$ IL-4eGFP⁺CD90.1⁺) wurden in Wildtyp-Empfängermäuse injiziert (5×10^5 Zellen/Maus) und 3 Tage nach erfolgter Nb/OVA-Infektion und intranasaler OVA-Gabe auf ihre Expansion und Proliferation hin untersucht. (A) Schema der Arbeitsschritte. (B) Zellaufreinigung durch FACS. Dargestellt ist ein repräsentatives Wolkendiagramm lebender $CD4^{+}KJ1-26^{+}$ Th-Zellen vor und nach der Reinigung. Die Expansion $CD4^{+}CD90.1^{+}$ Zellen in BALB/c-Mäusen (CD90.2) ist in einem weiteren, repräsentativen Wolkendiagramm (C) und einem Balkendiagramm (D, Mittelwert +SE) dargestellt. Das Experiment wurde erneut mit 3 Mäusen/Gruppe und mit gleichem Ausgang wiederholt. ($P=0,0061$ und $0,0207$). (E) Zellzahl (oben) und Frequenz (unten) von zuvor PKH26-gefärbten und transferierten Th-Zellen. Das Histogramm bzw. Balkendiagramm zeigt die Zellzahl/Frequenz negativer (IL-4eGFP⁻) und positiver (IL-4eGFP⁺) Zellen aus mLK von immunisierten bzw. naiven (-Nb) Empfängermäusen innerhalb von $CD4^{+}CD90.1^{+}$ Spenderzellen (Mittelwert +SD, n= 2 Mäusen/Gruppe). lo= low (engl. niedrig)

eindeutige Identifikation von Th2-Zellen. Darüber hinaus wurde dieser Mausstamm vergleichbar mit den zuvor beschriebenen Treg-Reportermäusen mit DO11.10-Mäusen, die transgen für einen OVA-spezifischen T-Zellrezeptor (TZR) sind, verpaart. Der adoptive Transfer dieser TZR-tg T-Zellen in Empfängermäuse ermöglicht neben einer definierten Ausgangspopulation die antigenabhängige Zellexpansion *in vivo* und folglich eine ausreichende hohe Anzahl an CD4⁺-Zellen für eine weitere durchflusszytometrische Reanalysen der Th-Zellpolarisierung.

Die Effizienz der Th2-Zelldifferenzierung und maximale Expansion dieser Zellen in unserem Nb/OVA-Modell ist mit einem adoptiven Transfer ausgehend von naiven, antigenspezifischen Vorläuferzellen (CD4⁺KJ1-26⁺CD44^{lo}IL-4eGFP⁻CD90.1⁺) aus DO11.10-4get-CD90.1-Mäusen in CD90.2-kongene Empfängertiere in den beiden Abbildungen 4 und 5 verdeutlicht. Um kontaminierende oder bereits differenzierte Th2-Zellen von dem Transfer auszuschließen, wurden aus der Milz und den Lymphknoten von DO11.10-4get-CD90.1-Mäusen nach der Oberflächenmarkierung durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper, naive (niedrige Expression von CD44), OVA-spezifische, aber IL4eGFP-negative T-Zellen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) hochrein fraktioniert und anschließend in BALB/c-Empfängertiere transferiert (Abb. 4A/B). Neben einer Nb/OVA-Infektion am Folgetag stellte sich eine weitere intranasale OVA-Gabe an Tag 4 als Applikationsweg für eine ausreichende Antigenprovokation in der Lunge heraus (Abb. 4C/D). An Tag 7 wurde die Lunge und der mLK der Empfängertiere präpariert und transferierte Zellen durch einen Antikörper gegen CD90.1, dem kongenen Oberflächenmarker der Spenderzellen, durchflusszytometrisch identifiziert. Im Vergleich zu naiven Empfängertieren, in denen nur eine marginale Frequenz von 0,01-0,05% an transferierten Zellen wiederzufinden war, resultierte die Applikation des Nb/OVA-Gemischs in einer fast 30-fach höheren Expansion der Spenderzellen, die sowohl in der Lunge als auch im mLK etwa 1-2% der Lymphozyten repräsentierten. Ferner konnte mit einem analogen Transfer von PKH-26 gefärbten Spenderzellen eine Proliferation durch die Verdünnung des fluoreszierenden Membranfarbstoffs in infizierten aber nicht in naiven Mäusen im FACS nachgewiesen werden (Abb. 4E). Im Unterschied zu transferierten Zellen, die weiterhin eine starke Fluoreszenz und somit keine Proliferation aufwiesen, durchliefen ausschließlich IL-4/eGFP⁺ zum Th2-Typ differenzierte Zellen mehrere aber nicht weiter quantifizierbare Zellzyklen. Neben Th2-Spenderzellen zeigten auch etwa 60% der eGFP⁻ Spenderzellen eine starke Proliferation. Die Effizienz der Th2-Differenzierung ausgehend von naiven Vorläuferzellen ist in beiden Organen an Tag 7 in einem Wolkendiagramm dargestellt (Abb. 5A und C). Über 50% der Zellen differenzierten in den Th2, IL-4eGFP-exprimierenden Phänotyp. Eine Expression der Th1- bzw. Th17-subtypischen Zytokine IFN- γ und IL-17A war mit Ausnahme in der Lunge für IL17A⁺ Spenderzellen nicht zu beobachten. Ebenfalls wurde nur eine sehr geringe Induktion von regulatorischen T-Zellen, die als naive Spenderzellen aus DO11.10-4get

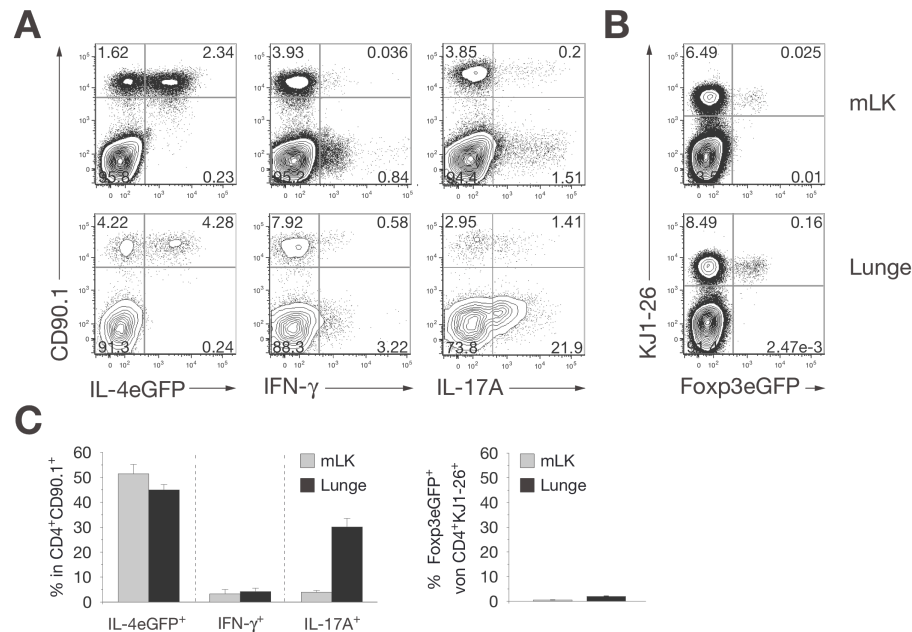


Abbildung 5. Polarisierung naiver T-Helferzellen in IL-4 produzierende Th2-Zellen durch adoptiven Transfer und Nb/OVA-Infektion.

(A) Naive Spenderzellen aus DO11.10-4get-CD90.1-Mäusen wurden nach dem Transfer in Wildtypmäuse und Nb/OVA-Infektion sowie intranasaler OVA-Gabe auf ihre Zytokinexpression durchflusszytometrisch analysiert. Die Analyse der Zytokine IFN-γ und IL-17A erfolgte mit den entsprechenden Sekretions-/Detektionskits. Dargestellt sind Konturen-Wolkendiagramme von lebenden CD4⁺ T-Zellen aus Lunge und mediastinalen Lymphknoten (mLN). (B) Analyse der Foxp3-Induktion nach Transfer von naiven CD4⁺ T-Zellen aus Foxp3eGFP-Reportermäusen (DEREG-Mäuse). Dargestellt sind lebende CD4⁺ Zellen. (C) Zusammenfassung der Frequenzen (+SD). n=3 Mäuse pro Zytokinanalyse.

DEREG-Mäusen isoliert und transferiert wurden, festgestellt. An Tag 7 nach der Nb/OVA-Infektion exprimierten lediglich 0,5-2% der Zellen den Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 in der Lunge bzw. den mLK von Empfänger-tieren (Abb. 5 B-C).

Naive Th-Zellen aus der Peripherie weisen keine CD4⁺ subtypenspezifischen Transkriptionsfaktoren oder Zytokine auf, die für polarisierte Effektorzellen charakteristisch sind. Sie stellen nicht differenzierte Vorläufer dar und ermöglichen aufgrund dessen, je nach Erreger und eingeleitetem Immunantworttyp, eine maximale Plastizität in ihrer Differenzierung hin zu einer entsprechenden T-Effektorzellpopulation. Der Einsatz sensitiver IL-4-Reportermäuse und die durchgeführten Transferexperimente ausgehend von naiven Th-Vorläuferzellen verdeutlichen dies. In Kombination mit der Verwendung antigenspezifischer Spenderzellen ist eine starke Expansion der Zellen *in vivo* und im Vergleich zu einer direkten Nb/OVA-Infektion von DO11.10-4get-Mäusen ohne Zelltransfer stärkere Th2-Polarisierung möglich. Neben einer effizienten und raschen Polarisierung vollzieht ein hoher Anteil der Spenderzellen in der akuten Phase nach der Infektion und der zweiten intranasalen OVA-Gabe ausschließlich eine Th2-Differenzierung in den beteiligten Organen. Aus den genannten Gründen wurde das entwickelte Zelltransfer-/Parasiteninfektionsmodell für die Untersuchung der *in vivo* Repolarisierung von Th1-, Th17- und Treg-Zellen in einen Th2-Phänotyp in den folgenden Experimenten verwendet.

Plastizität von CD4-positiven T-Effektorzellen im Kontext einer Wurmparasiteninfektion

Plastizität von Th1-Zellen

Aus therapeutischer Sicht erscheint eine Behandlung von Th1-dominierenden Autoimmunerkrankungen durch eine Parasiten-induzierte Verschiebung der unkontrollierten Immunreaktion hin zu einer protektiven Th2-Immunantwort attraktiv. Ein möglicher zu Grunde liegender Mechanismus – eine Repolarisierung von Th1- hin zu Th2-Zellen – wurde daher mit Hilfe des Parasitenmodells untersucht. Ausgegangen wurde dafür von zwei unterschiedlichen, *in vitro* hergestellten oder *ex vivo* isolierten Th1-Zellen (Abb. 6). Dafür wurden im Gegensatz zum beschriebenen Transfer naiver Spenderzellen, Milz- und Lymphknotenzellen aus DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen isoliert und unter antigenspezifischer Stimulation und in Anwesenheit von IL-12 zu Th1-Zellen *in vitro* differenziert. Während dieser Kultivierung durchlaufen die Zellen mehrere Zellzyklen und stellen am Ende der 5-tägigen Kultivierung ausdifferenzierte T-Helferzellen des Typ 1 dar. Im Unterschied erfolgte die *ex vivo* Isolierung OVA-spezifischer Th1-Spenderzellen aus Spendermäusen, die zuvor mit dem rekombinanten OVA kodierenden Impfvektor MVA-OVA immunisiert wurden. Beide Ausgangspopulationen wurden vor dem adoptiven Transfer, um eine hohe Zellreinheit zu erzielen und Sekundäreffekte von kontaminierenden Zellen auszuschließen, mit Hilfe Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung fraktioniert. Eine Identifikation und Visualisierung lebender IFN- γ -exprimierender Th1-Zellen im FACS wurde durch die Verwendung eines IFN- γ Sekretions-/Detektionskits nach einer PMA/

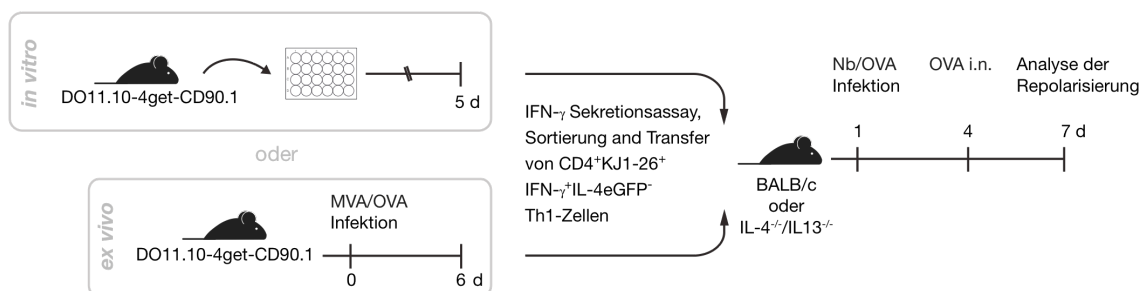


Abbildung 6. Schema der Repolarisierungsexperimente von *in vitro* hergestellten und *ex vivo* isolierten Th1-Zellen durch eine *N. brasiliensis*/Ovalbumin Infektion.

Schematische Darstellung der Experimente zur Untersuchung der Zelllinien-Flexibilität ausgehend von *in vitro* hergestellten oder *ex vivo* isolierten Th1-Zellen. Für die Analyse von antigenspezifischen Th1-Zellen wurden zunächst Lymphknoten- und Milzzellen von DO11.10-4get-CD90.1-Mäusen *in vitro* in Th1-Zellen durch das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ und dem entsprechenden Zytokininmilieu induziert. OVA-spezifische, lebende Th1-Zellen wurden nach einer 5-tägigen Kultivierung mittels eines IFN- γ Sekretions-/Detektionskits identifiziert und durch eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) aufgereinigt. Hochreine (>98% Reinheit) Th1-Zellen wurden im Anschluss in Wildtyp oder IL-4/IL-13 defiziente Empfängermäuse transferiert und nach Nb/OVA-Infektion auf ihre Möglichkeit der IL-4-Produktion hin untersucht. (B) Die Herstellung von OVA-spezifischen Th1-Zellen *in vivo* wurde durch die Infektion der Spendermäuse mit dem Impfvektor MVA-OVA erzielt. Der nicht-replikative Vektor kodiert für das Protein Ovalbumin (OVA), so dass 6 Tage nach Infektion Th1-Zellen analog zu *in vitro* hergestellten Zellen isoliert und analysiert werden konnten.

Ionomycin-Stimulation ermöglicht. Der adoptive Transfer von Th1-Populationen und deren Konfrontation mit der Nb/OVA-Infektion erfolgte wie zuvor beschrieben. An Tag 7 nach dem Transfer der hochreinen (>99%, Abb. 7A) CD4⁺KJ1-26⁺IFN- γ ⁺IL-4eGFP⁻CD90.1⁺ Spenderzellen, wurde deren Expansion und Polarisierung durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 7B/C). Gleichwohl die Expansion der transferierten Th1-Zellen im Vergleich zu naiven Spenderzellen um etwa 50% geringer ausfiel, wiesen 40% der vormals IFN- γ -positiven Zellen sowohl in der Lunge als auch im mLK der Empfängermäuse keine IFN- γ -Expression mehr auf. Darüber hinaus konnte bei 30% der Spenderzellen eine IL-4eGFP Expression und somit Repolarisierung in den T-Helferzell-2-Typ beobachtet werden. Bemerkenswerterweise war die Frequenz IL-4-positiver Zellen unabhängig von der IFN- γ Expression Zellen etwa vergleichbar. Zusätzlich zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die vier einzelnen Lungenzellpopulationen nach ihrem Zytokinprofil am FACS sortiert und anschließend einer RNA-Isolation sowie reversen Transkription in cDNA unterzogen. Eine semi-quantitative PCR der Markertranskriptionsfaktor-mRNA T-bet und Gata3 von Th1- bzw. Th2-Zellen innerhalb dieser Proben spiegelte das nachgewiesene Zytokinexpressionsprofil wieder (Abb. 7D). Zellen die keines der untersuchten Zytokine exprimierten, wiesen weder T-bet- noch Gata3-mRNA-Level auf. Ausschließlich Zellen, die einzig IFN- γ oder IL-4 transkribierten und somit vollständig konvertierten verfügten über ein 2,5x höheres und entgegengesetztes Transkriptionsfaktorlevel. Des Weiteren wiesen die repolarisierten vormals Th1-Zellen keinen Unterschied in ihrer Lokalisation im mLK im Vergleich zu Th2-Zellen, die aus naiven Spenderzellen differenzierten, auf. Abbildung 7E zeigt die histologische Untersuchung von mLK-Gewebsschnitten an Tag 7 nach dem Transfer und der Nb/OVA-Infektion. Neben der wie zuvor beobachteten geringeren Expansion von Th1-Zellen vergleichend zu naiven Spenderzellen konnten repolarisierte Zellen (CD90.1⁺eGFP⁺) sowohl in der T-Zellzone als auch in der mit einem Anti-B220 Antikörper angefärbten B-Zellzone gefunden werden.

Für eine Differenzierung von Th2-Zellen ist das Schlüsselzytokin IL-4 notwendig, wobei eine autokrine IL-4 Versorgung der T-Zellen in Kombination mit dem Zytokin IL-2 für einen stabile Differenzierung hinlänglich erscheint (Liu et al., 2005). Aus diesem Grund wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, ob autokrines oder exogenes IL-4 in dem beobachteten Redifferenzierungsprozess von Th1- hin zu Th2-Zellen eine Rolle spielt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden wie zuvor aufgereinigte Th1-Spenderzellen gewonnen, jedoch für den anschließenden adoptiven Transfer nicht Wildtypempfängermäuse, sondern IL-4/IL-13-defiziente Rezipienten verwendet. Etwa 65-70% der Spenderzellen in diesen Mäusen wiesen trotz einer starken Expansion in der Lunge eine anhaltende IFN- γ -Expression 6 Tage nach der Parasiteninfektion auf (Abb. 8A/B). Trotz der reduzierten Repolarisationsfrequenz im Vergleich zu Zellen, die in BALB/c-Wildtypempfänger transferiert wurden (Abb. 7), konnte in 15-25% der sowohl IFN- γ ⁺ als auch IFN- γ ⁻ Spenderzellen eine IL-4eGFP-Expression festgestellt werden.

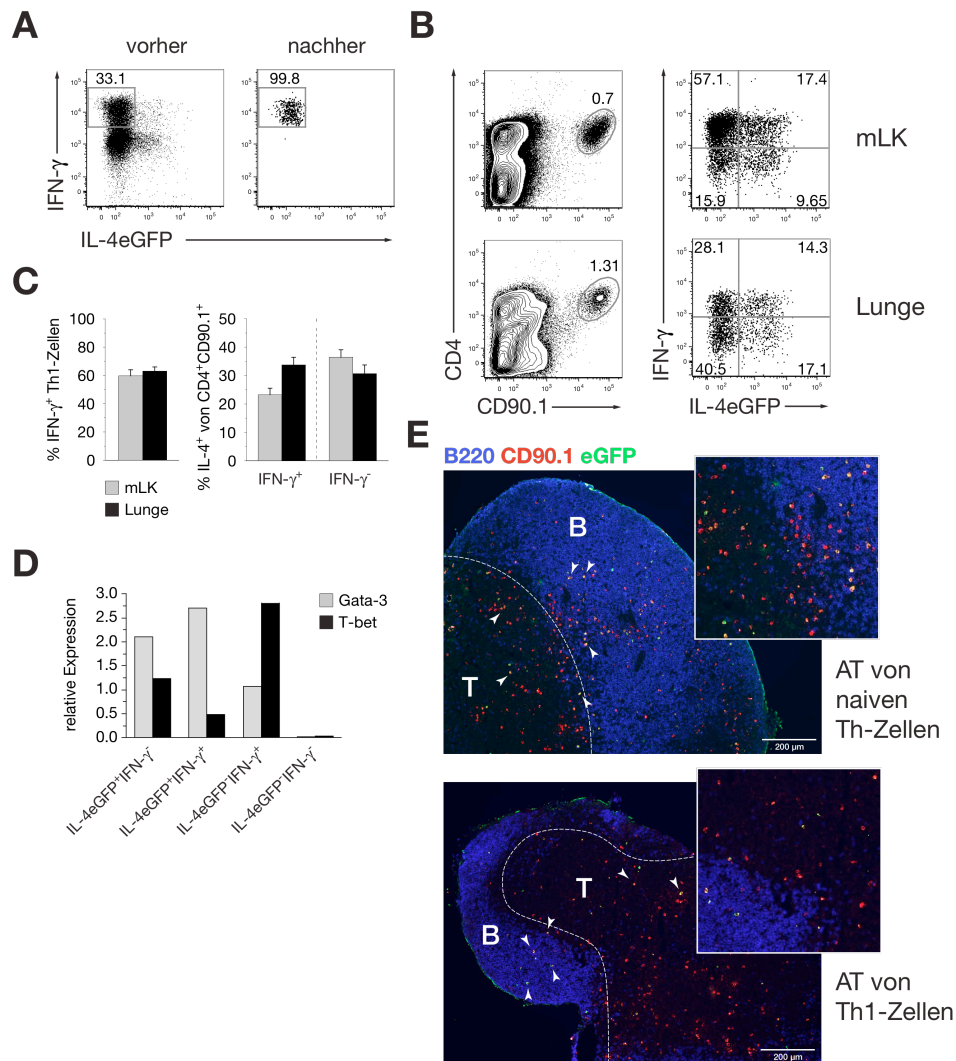


Abbildung 7. Effiziente Repolarisierung *in vitro* hergestellter Th1- in Th2-Zellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion.

(A) Aus DO11.10-4get-CD90.1-Mäusen wurden *in vitro* Th1-Zellen antigenspezifisch polarisiert, mittels eines IFN- γ Sekretions-/Detektionskits identifiziert und durch eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) isoliert. Exemplarisch ist ein Wolkendiagramm von CD4⁺KJ1-26⁺ T-Zellen vor und nach der Reinigung gezeigt. Reine OVA-spezifische Th1-Zellen (CD4⁺KJ1-26⁺IFN- γ ⁺IL-4eGFP⁺CD90.1⁺) wurden direkt im Anschluss in BALB/c-Wildtypmäuse (CD90.2) transferiert (5x10⁵ Zellen/Maus) und 3 Tage nach erfolgter Nb/OVA-Infektion und intranasaler OVA-Gabe auf die IL-4-Expression hin durchflusszytometrisch untersucht. (B) Exemplarisch sind die Expansion (links), sowie die IFN- γ - bzw. IL-4eGFP-Expression (rechts) von lebenden CD4⁺CD90.1⁺ Spenderzellen in der Lunge und mediastinalem Lymphknoten (mLN) dargestellt. Zur Identifizierung von IFN- γ exprimierenden Zellen wurde der bei der Isolierung verwendete IFN- γ Sekretions-/Detektionskit genutzt. (C) Graphische Zusammenfassung stabiler Th1-Zellen innerhalb der Spenderzellen (CD4⁺CD90.1⁺, links) bzw. von repolarisierten IL-4eGFP exprimierenden IFN- γ ⁺ und IFN- γ ⁻ Zellen (rechts) in einem Balkendiagramm. Mittelwerte (+SD); n=10 aus 5 unabhängigen Experimenten. (D) Exemplarische semiquantitative PCR-Analyse (qPCR) der mRNA von Transkriptionsfaktoren T-bet und Gata-3 im Vergleich zu dem Haushaltsgen β -Aktin in den angegebenen Zellsubpopulationen. 15 Lungenzellen wurden nach der Repolarisierung erneut mittels FACS isoliert und unter Verwendung eines Einzelzell-RT-PCR- und SYBR-Green-Kits mittels qPCR quantifiziert. (E) Immunhistologische Analyse der Lokalisierung von transferierten naiven bzw. Th1-Zellen nach Repolarisierung durch Nb/OVA-Infektion im mLN. Pfeile zeigen einzelne doppeltgefärbte eGFP⁺ CD90.1⁺ Spenderzellen. Die Färbung von B220⁺ B-Zellen (CD45R; blau) erlaubte die Identifizierung der T-Zellzone (T) bzw. der B-Zellfollikel (B). n=3 Mäuse/Gruppe. AT, adoptiver Transfer.

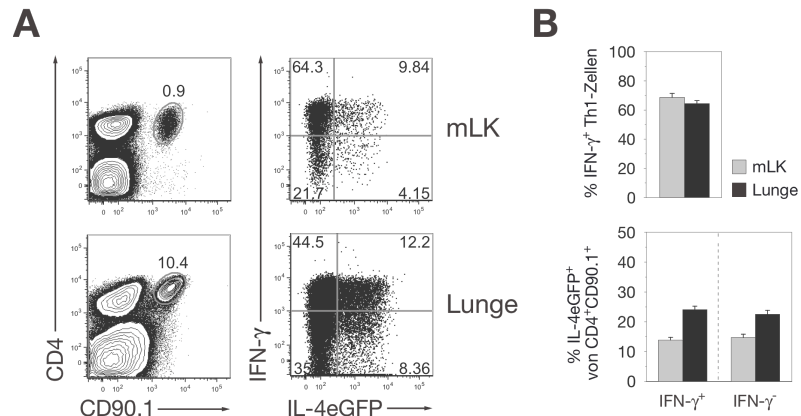


Abbildung 8. IL-4/IL-13 unabhängige Repolarisierung antigenspezifischer Th1-Zellen in IL-4/IL-13-defizienten Mäusen nach Nb/OVA-Infektion.

Analog zum Transfer *in vitro* hergestellter, OVA-spezifischer Th1-Zellen in BALB/c-Mäuse wurden ebenfalls 5×10^5 hochreine Zellen/Maus in IL-4/IL-13-defiziente Mäuse adoptiv transferiert. Die Infektion erfolgte durch subkutane Nb/OVA- und intranasaler OVA-Gabe wie zuvor. (A) Dargestellt ist die Expansion lebender Lymphozyten (links) bzw. die Zytokinexpression von CD4⁺CD90⁺ Spenderzellen (rechts) 7 Tage nach Transfer. Zur Identifizierung von IFN- γ exprimierenden Zellen wurde der bei der Isolierung verwendete IFN- γ -Sekretions-/Detektionskit genutzt. (B) Zusammenfassung der Frequenzen von verbliebenen Th1-Zellen innerhalb der Spenderzellen (CD4⁺CD90.1⁺, oben) bzw. von repolarisierten IL-4eGFP exprimierenden IFN- γ ⁺ und IFN- γ ⁻ Zellen (unten). Dargestellt ist der Mittelwert (+SD) von mindestens 5 Mäusen aus 2 unabhängigen Experimenten.

Insgesamt konnte durch den Transfer von Th1-Spenderzellen gezeigt werden, dass ein hoher Anteil *in vitro* differenzierter Th1-Effektorzellen innerhalb weniger Tage nicht nur ihre spezifische IFN- γ -Expression durch die Parasiteninfektion verlieren, sondern vollständig zu IL-4 produzierenden Th2-Zellen *in vivo* konvertieren können. Die Expression des entgegengesetzten neuen Zytokins konnte auch auf Ebene der Markertranskriptionsfaktoren, welche die Zytokinexpression regulieren und einleiten, bestätigt werden. Darüber hinaus deutete die in einem geringeren Ausmaß beobachtete Differenzierung der Zellen in IL-4/IL-13 defizienten Mäusen auf eine nicht essentielle aber verstärkende Funktion von exogenem IL-4 und IL-13, die von T-Zellen, Mastzellen und eosinophilen sowie basophilen Granulozyten sekretiert werden können, hin.

Die bisher beschriebene Zellrepolarisierung wurde anhand *in vitro* hergestellter Spenderzellen beobachtet. Diese Differenzierung erfolgte lediglich mit den Zytokinen IL-2 und IFN- γ , was das Zytokinmilieu *in vivo* und die Th1-Entstehung möglicherweise nur unzureichend reflektiert. Aus diesem Grund wurde in weiteren Transferexperimenten die Zelllinienstabilität *ex vivo* isolierter Th1-Zellen im Kontext der Parasiteninfektion untersucht. Zu diesem Zweck galt es zunächst ein Modell zur Induktion einer antigenspezifischen Typ1-Immunantwort in Mäusen zu etablieren um eine ausreichend hohe Anzahl an Th1-Spenderzellen *ex vivo* isolieren zu können. Die Abbildung 9A stellt einen Infektionsverlauf anhand von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des OVA-kodierenden Impfvectors (MVA-OVA) vergleichend zu einem murinen CM-Virus (MCMV-

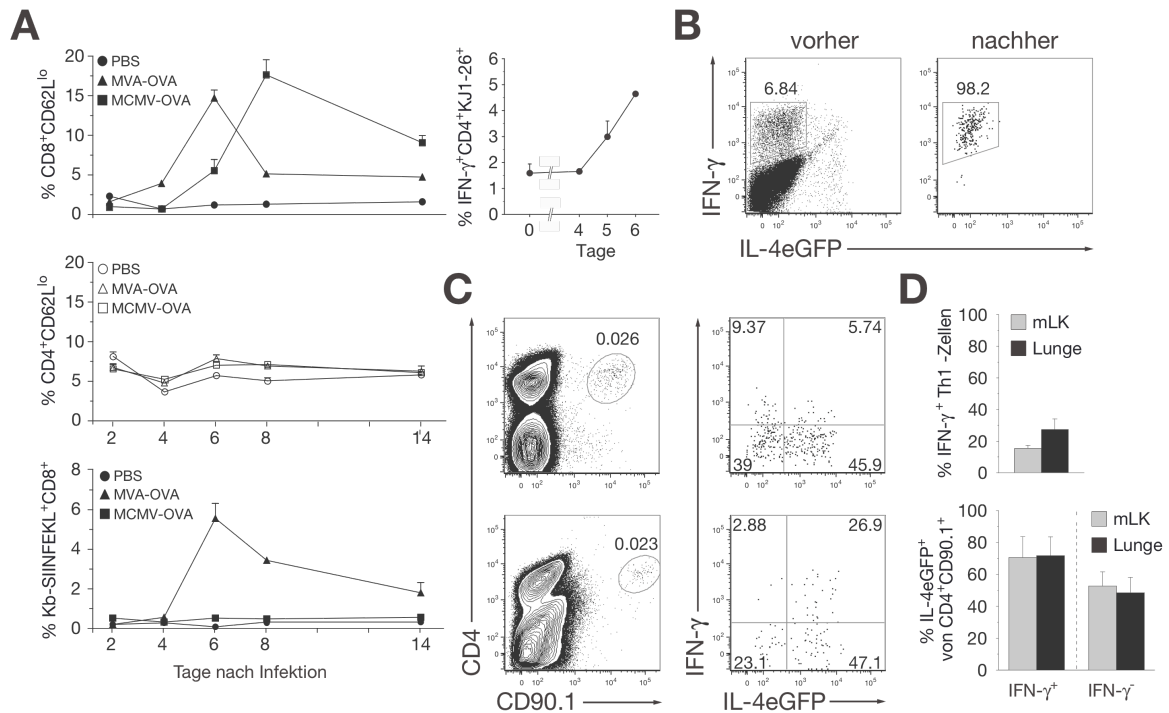


Abbildung 9. Vollständige Repolarisierung ex vivo isolierter Th1-Zellen in IL-4 exprimierende Th2-Zellen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion.

(A) Modell zur Herstellung von OVA-spezifischen Th1-Zellen *in vivo*. Gezeigt ist der Verlauf einer MVA-OVA (10^7 pfu/Maus) bzw. MCMV-OVA (10^5 pfu/Maus) Infektion in C57BL/6-Wildtypmäusen als Frequenzen von CD4⁺ bzw. CD8⁺CD62L⁺ T-Zellen (n=2 Mäuse/Zeitpunkt). Die Identifizierung von Ovalbumin-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (MHC Klasse I(H2-Kb)-SIINFEKL) wurde mittels Pentamerfärbung erzielt. Der Graph rechts zeigt den Verlauf der Infektion mit dem Impfvektor MVA-OVA (10^7 pfu/Maus) in DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen. Die Frequenz OVA-spezifischer Th1-Zellen in der Milz wurde durch intrazelluläre IFN-γ Färbung nach den angegebenen Tagen post Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Exemplarische Wolkendiagramme vor und nach erfolgter *ex vivo* Isolierung von Th1-Zellen aus DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen 6 Tage nach MVA-OVA Infektion. Hochreine antigenspezifische Th1-Zellen (CD4⁺KJ1-26⁺IFN-γ⁺IL-4eGFP⁺CD90.1⁺) wurden analog zu *in vitro* hergestellten Th1-Zellen transferriert (5×10^4 Zellen/Maus) und nach Infektion der Empfängerermäuse die Repolarisierung in der Lunge und mediastinalen Lymphknoten (mLN) reanalysiert. (C) Expansion (links), sowie die IFN-γ bzw. IL-4eGFP-Expression von lebenden CD4⁺CD90.1⁺ Spenderzellen in der Lunge (rechts unten) und mLN (rechts oben) dargestellt. (D) Graphische Zusammenfassung stabiler Th1-Zellen innerhalb der Spenderzellen (CD4⁺CD90.1⁺, oben) bzw. von repolarisierten IL-4eGFP⁺ exprimierenden IFN-γ⁺ und IFN-γ⁻ Zellen (unten) in einem Balkendiagramm. Zur Identifizierung von IFN-γ exprimierenden Zellen wurde sowohl bei der *ex vivo* Isolierung als auch der Reanalyse der Spenderzellen der IFN-γ Sekretions-/Detektionskit nach 4h PMA/Ionomycin Stimulation genutzt. Mittelwerte (+SD) n= 3 aus 3 unabhängigen Experimenten.

OVA) in C57BL/6-Wildtypmäusen über zwei Wochen dar. Im Gegensatz zu dem nicht-repetitiven MCMV-OVA, dessen Infektion neben einer Splenomegalie ausschließlich einen gering höheren Anstieg an aktivierten CD8⁺ T-Zellen an Tag 8 zufolge hatte, konnten mittels einer OVA-epitopspezifischen Pentamerfärbung zusätzlich in mit dem Impfvektor immunisierten Mäusen OVA-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifiziert werden. Aufgrund des vergleichbar stärkeren Verlaufs und der Tatsache, dass auch eine Infektion von DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen in einer ausreichend hohen Frequenz von OVA-spezifischen Th1-Zellen in der Milz resultierte, wurde der MVA-OVA-Impfvektor für die *in vivo* Gewinnung von Th1-Zellen verwendet (Abb. 9A, rechts). Trotz der starken Induktion an Th1-Zellen und der Verwendung

mehrerer Spendermilzen war es jedoch nicht möglich die selben Zellzahlen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Experimenten pro Maus zu transferieren. Eine Isolation und Aufreinigung von IFN- γ produzierenden, OVA-spezifischen Th1-Zellen aus der Milz der infizierten Mäuse an Tag 6 ist beispielhaft in einem Wolkendiagramm dargestellt (Abb. 9B). Der darauffolgende Transfer von jeweils 5×10^4 Zellen in BALB/c-Empfängertiere und die Infektion mit dem Nb/OVA-Gemisch wurde erneut wie in den zuvor beschriebenen Experimenten durchgeführt. Eine Identifikation und durchflusszytometrische Reanalyse der Spenderzellen erfolgte wiederum an Tag 7 nach dem Transfer durch eine Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen den kongenen Marker CD90.1 und CD4, sowie nach einer kurzen *in vitro* Stimulation mit einem IFN- γ -Detektions-/Sekretionskit. Die Spenderzellen stellten eine sehr kleine Population dar und waren unter Berücksichtigung der 10fach weniger eingesetzten Menge dennoch im Vergleich zu *in vitro* isolierten Th1-Zellen weniger stark expandiert (Abb. 9C). Dessen ungeachtet verloren 70-80% der Spenderzellen ihre IFN- γ -Expression und die Hälfte exprimiert statt dessen IL-4eGFP. Der höhere Anteil an IL-4eGFP⁺ Zellen wurde jedoch in stabilen anhaltend IFN- γ -exprimierenden Spenderzellen beobachtet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *ex vivo* isolierte Th1-Zellen wie *in vitro* differenzierte Spenderzellen während einer akuten Nb-Infektion antigenabhängig in den Th2-Phänotyp differenzieren können.

Plastizität von Th17-Zellen

Th17-Zellen stellen vor allem durch ihre Produktion der entzündungsfördernden Zytokine IL-17, IL-6 und IL-21 in autoimmunen entzündlichen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn eine Schlüsselrolle dar. Im Gegensatz zu den anderen CD4 positiven Effektorzellen scheint allerdings der Differenzierungsstatus von Th17-Zellen im Vergleich variabler zu sein. So wurde bisher die Möglichkeit von Th17-Zellen in IFN- γ oder Foxp3 exprimierende Th1 bzw. regulatorische T-Zellen zu differenzieren beschrieben (Bending et al., 2009; Lee et al., 2009). Jedoch blieb bisher ungeklärt, ob Th17- in Th2-Zellen konvertierbar sind. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Repolarisierung ebenfalls mit Hilfe des Nb/OVA-Modells überprüft. Die Abbildung 10A zeigt die Fraktionierung unter IL-6 und TGF- β 1 *in vitro* differenzierter, OVA-spezifischer Th17-Zellen ausgehend von den zuvor beschriebenen DO11.10-4get-CD90.1 Milz- und Lymphknotenzellen. Lebende IL-17A-Produzenten wurden an Tag 5 der Kultivierung mit einem IL-17A-Sekretions-/Detektionskit identifiziert, durch FACS aufgereinigt und im Anschluss hochreine IL17A⁺IL4eGFP⁻ Zellen in naive Empfängermäuse transferiert. Die durchflusszytometrische Reanalyse der CD4- und CD90.1-positiven Spenderzellen nach der Infektion ergab, dass sowohl in der Lunge als auch im mLK etwa 60 bzw. 75% der ehemals Th17-Zellen die Eigenschaft, IL-17A zu produzieren,

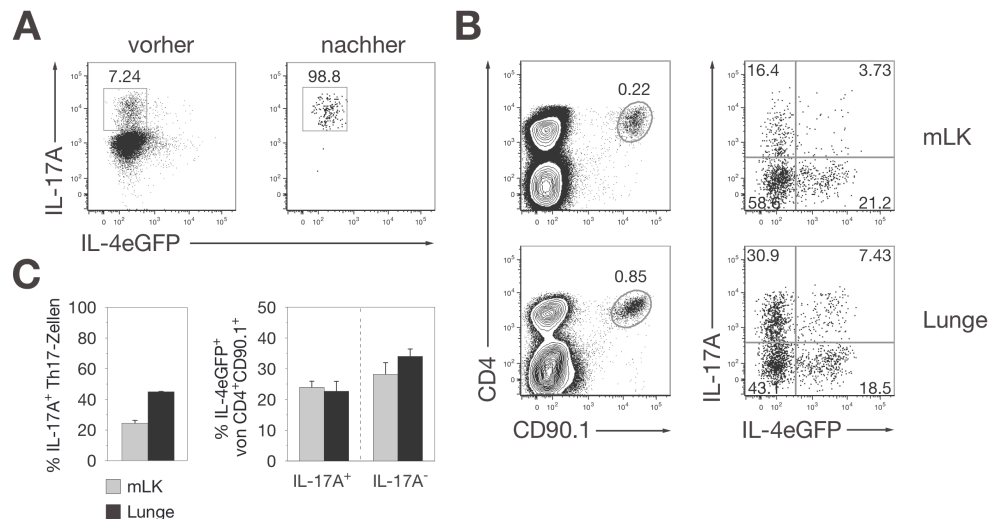


Abbildung 10. Adoptiv transferierte, *in vitro* hergestellte Th17-Zellen exprimieren nach einer Nb/OVA-Infektion das Th2-Zytokin IL-4.

Analog zur gezeigten Repolarisierung *in vitro* erzeugter Th1-Zellen wurde die Flexibilität von Th17-Zellen im selben Versuchsmodell untersucht. Die *in vitro* Generation wurde durch eine vergleichbare 5-tägige Kultivierung von DO11.10-4get-CD90.1-Zellen unter Th17-Konditionen erzielt und lebende Zellen im Anschluss durch FACS isoliert. (A) Repräsentative Wolkendiagramme zeigen CD4⁺KJ1-26⁺ Zellen, die durch ein IL-17A-Sekretions-/Detektionskit identifiziert wurden, vor und nach durchgeführter Sortierung. Die Reanalyse der Spenderzellen nach Infektion der BALB/c-Empfängermäuse erfolgte analog wie zuvor beschrieben mit Nb/OVA, jedoch unter Verwendung des IL-17A-Sekretions-/Detektionskits. (B) Exemplarische Konturen-Wolkendiagramme von lebenden Lungen- bzw. mLN-Zellen (links), sowie von IL-17A bzw. IL-4eGFP exprimierenden CD4⁺CD90.1⁺ Spenderzellen. (C) Graphische Zusammenfassung von verbleibenden Th17-Zellen innerhalb der Spenderzellen (CD4⁺CD90.1⁺, links) bzw. von repolarisierten IL-4eGFP exprimierenden IL-17A⁺ und IL-17A⁻ Zellen (rechts) in einem Balkendiagramm. Die gezeigten Mittelwerte und Standardfehler wurden aus 2 unabhängigen Experimenten und 3 Mäusen erzeugt.

verloren haben. Darüber hinaus waren 20-30% dieser Zellen zudem in der Lage, IL-4eGFP zu koexprimieren, was die Repolarisierung auch dieses T-Helferzellsubtyps reflektiert. Der Anteil an vollständig repolarisierten Th17-Zellen, die ausschließlich IL-4eGFP exprimierten, fiel in beiden Organen im Vergleich zu Zellen, die beide Zytokine exprimierten, um 5-10% höher aus.

Parallel galt es die funktionelle Plastizität von *ex vivo* isolierten Th17-Zellen zu verifizieren. In Vorversuchen konnte beobachtet werden, dass eine einmalige intranasale Gabe von OVA in DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen eine Expansion IL-17A produzierender Th-Zellen ausschließlich in der Lunge zur Folge hatte. Die Abbildung 11A stellt diese Beobachtung in einem Wolkendiagramm dar. Im Vergleich zu mit PBS behandelten Mäusen, induzierte die einmalige i.n. OVA-Gabe neben einer nicht-signifikanten Frequenz an IL-17A-Produzenten in den mLK in 18% der stimulierten Lungenzellen eine effiziente IL-17A-Sekretion. Dieser nicht weiter untersuchte Befund der Th17-Induktion wurde daher für die Herstellung und Isolation von T-Zellen des Th17-Typs ausgenutzt. Um eine ausreichend hohe Anzahl an Th17-Zellen gewinnen zu können, wurde folglich mehreren Spendermäusen OVA i.n. appliziert. Wie im Vergleich zu *in vivo* gewonnenen Th1-Zellen, konnten jedoch ebenfalls nur 5×10^4 Zellen pro Rezipient

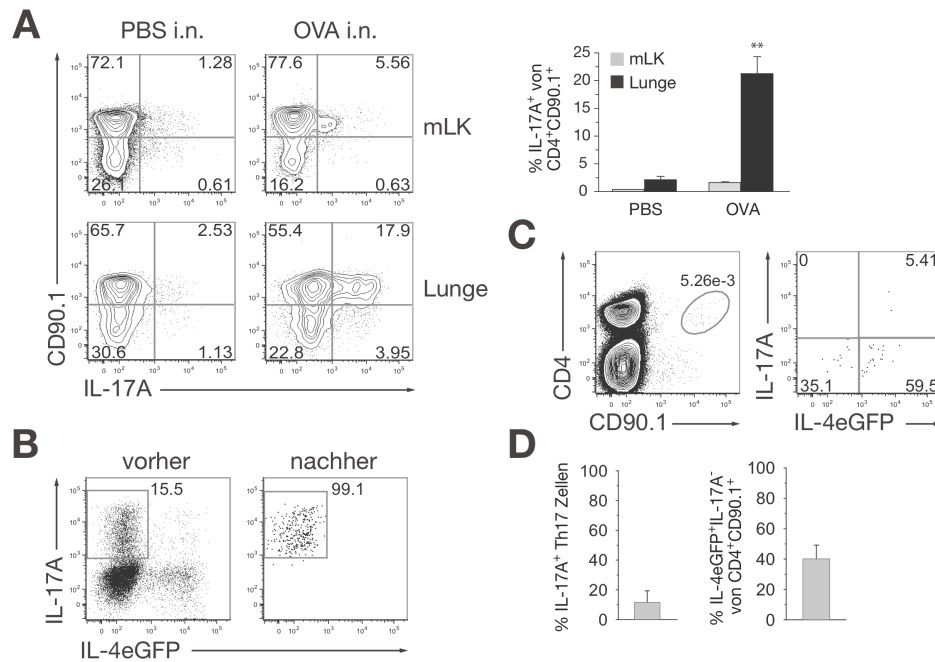


Abbildung 11. Ex vivo isolierte Th17-Zellen weisen nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion eine hohe Flexibilität auf.

(A) Induktion von IL17A⁺ Th17-Zellen in DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen 3 Tage nach einmaliger intranasaler OVA-Gabe (i.n.; 50 µg/Maus) im Vergleich zu Kontrollmäusen denen i.n. PBS appliziert wurde. Gezeigt sind exemplarische Konturen-Wolkendiagramme von lebenden Lungenzellen bzw. Lymphozyten (links) und die Zusammenfassung der erhobenen Mittelwerte (+SD) in einem Balkendiagramm (rechts; n= 2-4 Mäuse pro Gruppe; P=0,0036). (B) OVA-spezifische Th17-Zellen wurden 3 Tage nach i.n. OVA-Gabe aus der Lunge, nach Identifizierung IL-17A⁺ Zellen durch den entsprechenden Sekretions-/Detektionskit, durch FACS isoliert. 3-6x10⁴ CD4⁺KJ1-26⁺IL-17A⁺IL-4eGFP⁻CD90.1⁺ Th17-Zellen wurden pro BALB/c-Maus transferiert und 6 Tage nach Nb/OVA-Infektion analysiert. (C) Exemplarische Konturen-Wolkendiagramme von lebenden Lungenzellen (links) bzw. IL-17A oder IL-4eGFP expremierende CD4⁺CD90.1⁺ Spenderzellen (rechts). (D) Frequenzen von verbleibenden Th17-Zellen innerhalb der Spenderzellen (CD4⁺CD90.1⁺, links) bzw. von repolarisierten IL-4eGFP⁺ früheren Th17-Zellen (rechts) in mLN. Mittelwerte (+SD) n=4 aus 4 unabhängigen Experimenten.

transferiert werden. Die Aufreinigung der Zellen aus dem Lungengewebe wurde wie zuvor beschrieben mit Hilfe eines IL-17A-Sekretions-/Detektionskit durch FACS gefolgt vom adoptiven Transfer in BALB/c CD90.2-kongene Empfängerermäuse durchgeführt (Abb. 11B). Entgegen der bisherigen Beobachtungen konnten die Spenderzellen nur in den mLK, aber nicht in der Lunge nach der Nb/OVA-Infektion wieder gefunden werden (Abb. 11C). Ob dies aus einer mangelnden Rekrutierung von Th17-Zellen in die Lunge während der Parasiteninfektion resultierte oder nur der geringen Anzahl an Spenderzellen geschuldet war, konnte nicht weiter untersucht werden. Dessen ungeachtet verloren fast 90% der stimulierten und reanalysierten Spenderzellen, die im mLK eine sehr geringe aber distinkte Population darstellten, ihre Eigenschaft IL-17A zu sekretieren. Darüber hinaus konnte innerhalb dieser Population eine vollständige Repolarisierung der vormals IL17A⁺ Zellen hin zu IL-4eGFP produzierenden Th2-Zellen festgestellt werden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass ebenso wie *in vitro* differenzierte auch *ex vivo* gewonnene Th17-Zellen ein hohes Maß an Flexibilität in

ihrem Zytokineexpressionsprofil aufweisen. Diese Flexibilität, die wie einleitend beschrieben bisher nur für die Expression des Zytokins IFN- γ und den Transkriptionsfaktor Foxp3 beobachtet wurde, konnte mit Hilfe des Nb/OVA-Transfermodells auch für das Th2-Markerzytokin IL-4 bestätigt werden.

Plastizität von regulatorischen T-Zellen

Die Plastizität von natürlichen und induzierten Treg-Zellen wird anhaltend kontrovers diskutiert und ist Gegenstand aktueller Forschung. Einige Studien zeigen, dass *ex vivo* isolierte nTregs im Gegensatz zu iTregs durchaus IL-17- und IFN- γ exprimieren können (Wei et al., 2009; Yang et al., 2008a; Zhou et al., 2009), andere Gruppen beschreiben aber, dass nTregs in ihrer Foxp3 Expression stabil und nicht in andere Subtypen konvertierbar sind (Komatsu et al., 2009; Rubtsov et al., 2010). Um diese Kontroverse zu klären, wurde die Flexibilität von Treg-Zellen ebenfalls *in vivo* anhand zweier unterschiedlicher Ausgangspopulationen *in vitro* und *in vivo* differenzierten Tregs zunächst mit Hilfe von DEREK-Reportermäusen untersucht. Die Identifikation wurde dabei im Vergleich zu den anderen Subtypen nicht durch das

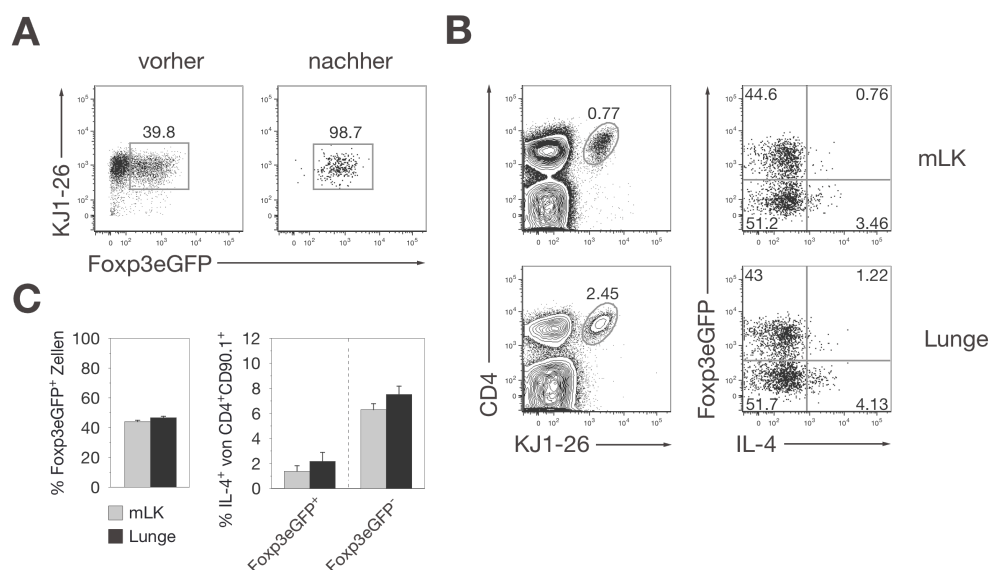


Abbildung 12. *In vitro* hergestellte regulatorische T-Zellen weisen eine nahezu stabile Differenzierung nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.

Analog zu gezeigten Transfer- und Repolarisierungsexperimenten von Th1- und Th17-Zellen wurden induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) untersucht, wobei Foxp3eGFP-Reportermäuse verwendet wurden. Milzzellen dieser Mäuse wurden in einer 5-tägigen Kultur unter iTreg-Konditionen differenziert und OVA-spezifische iTregs nach ihrer Foxp3-Expression hin durch FACS sortiert. (A) Wolkendiagramme von CD4⁺ Zellen vor und nach der Sortierung von CD4⁺KJ1-26⁺Foxp3eGFP⁺ Zellen. Die Analyse von 5x10⁵ Spenderzellen nach adoptivem Transfer pro BALB/c-Maus ist in einem Kontur-Wolkendiagramm (B) dargestellt bzw. in einem Balkendiagramm (C) zusammengefasst. n= 3 pro Gruppe. IL-4-produzierende CD4⁺KJ1-26⁺ Spenderzellen wurden mit Hilfe eines IL-4-Sekretions-/Detektionskits nachgewiesen, durchflusszytometrisch analysiert und sind gegen die Foxp3eGFP-Expression aufgetragen (B, rechts).

Zytokinexpressionsprofil, sondern auf Ebene des Markertranskriptionsfaktors Foxp3 erzielt, da keine anderen eindeutigen Markerzytokine oder Reportermaüse für eine direkte Treg-Identifikation und Detektion bislang beschrieben sind.

Zunächst wurden OVA-spezifische iTreg-Zellen durch die Kultivierung von Milzzellen aus DO11.10-DEREG-Mäusen zusammen mit OVA₃₂₃-Peptid und TGF- β 1 gewonnen und CD4⁺KJ1-26⁺Foxp3eGFP⁺ iTreg-Zellen durch FACS mit einer 99%igen Reinheit isoliert und adoptiv transferiert (Abb. 12A). Am Folgetag wurden vergleichend zu den zuvor beschriebenen Experimenten anhand einer subkutanen Nb/OVA-Applikation und einer weiteren Antigenprovokation durch eine i.n. OVA-Gabe am dritten Tag expandiert und mit der Parasiteninduzierten Typ-2-Immunantwort konfrontiert. Die Reanalyse der Spenderzellen am Durchflusszytometer erfolgte nach einer kurzen *in vitro* Stimulation mit einem IL-4-Sekretions-/Detektionskit und zeigt eine zu naiven Spenderzellen vergleichbare Expansion der iTreg-Zellen in den untersuchten Organen (Abb. 12B). Obwohl etwa 60% der Zellen durch die fehlende Foxp3eGFP-Expression nicht mehr dem iTreg-Phänotyp zuzuordnen sind, konnte eine IL-4-Sekretion und somit Repolarisierung zu Th2-Zellen nur in etwa 6-8% der ehemals iTreg-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte innerhalb von Zellen, die anhaltend eGFP und damit den Markertranskriptionsfaktor transkribieren, ein weit geringerer 1-2% großer Anteil mit einem doppelten Th-Zellphänotyp gefunden werden. Daher scheint eine Redifferenzierung von iTreg-Zellen *in vivo* durch die induzierte Parasiteninfektion nicht möglich. Auch *ex vivo* isolierte natürlich auftretende Treg-Zellen verdeutlichten die Rigidität dieses CD4⁺ T-Zellsubtyps. Eine Gewinnung von nTreg-Zellen konnte direkt ohne vorherige Induktion aus DO11.10-DEREG-Mäusen erreicht werden. Die Fraktionierung von CD4⁺KJ1-26⁺Foxp3eGFP⁺ nTreg-Zellen ist in Abbildung 13A dargestellt. Die Reanalyse erfolgte erneut nach der Infektion an Tag 6 durch einen IL-4-Sekretions-/Detektionskit und ergab, dass weniger als 2% der nTreg-Zellen IL-4 sekretierten. Mehr als 85% wiesen eine anhaltende Foxp3eGFP-Expression auf (Abb. 13B/C).

Um auszuschließen, dass eine geringe IL-4-Sekretion in den transferierten nTreg durch den verwendeten, weniger sensitiven IL-4-Sekretions-/Detektionskit nicht dargestellt werden kann, wurden parallel CD4⁺CD44^{lo}CD25⁺IL4GFP⁻ Tregs aus IL-4-Reportermausen isoliert. Die Färbung gegen das Glykoprotein CD44 diente dabei zur Unterscheidung von aktivierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, welche eine starke Expression im Verhältnis aufwiesen (Abb. 14A). Durch den Transfer dieser Zellen war es möglich eine vermeintliche IL-4-Expression ohne vorherige Stimulation direkt im Durchflusszytometer zu verfolgen. Wie zuvor konnte eine Expansion im Vergleich zum Transfer naiver T-Zellen beobachtet werden. Jedoch konnte keine Expression des Th2-Markerzytokins durch die direkte GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Über 90% der Zellen zeigten darüber hinaus eine kontinuierliche CD25-Expression (Abb. 14B).

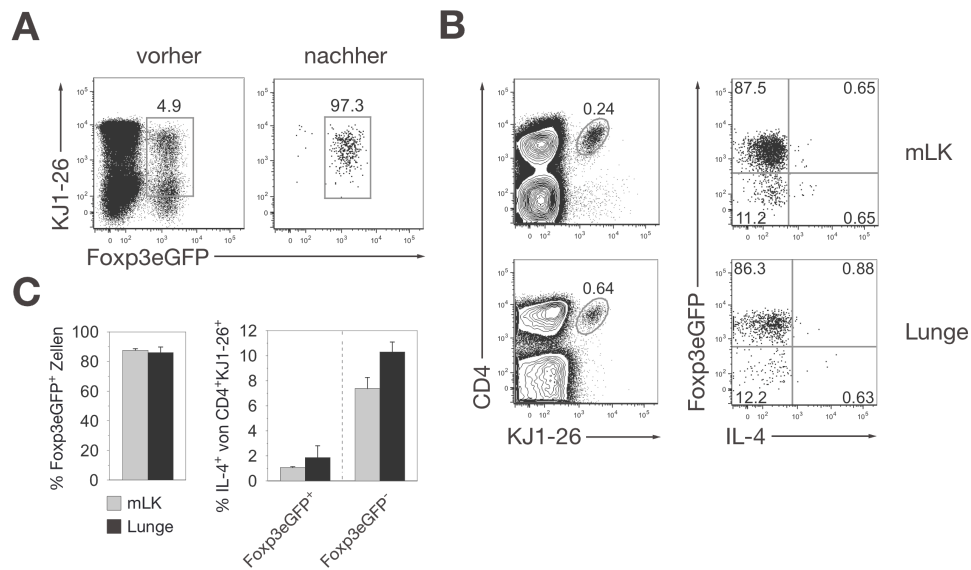


Abbildung 13. Ex vivo isolierte, natürliche regulatorische T-Zellen zeigen keine Plastizität nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.

Natürliche Tregs (nTreg) wurden direkt aus der Milz und den Lymphknoten von DO11.10-DEREG-Mäusen mittels FACS isoliert. (A) Die Wolkendiagramme zeigen die exemplarische Aufreinigung von $CD4^+KJ1-26^+Foxp3eGFP^+$ nTregs. Nach dem Transfer von 5×10^5 Zellen pro BALB/c-Maus wurden die Spenderzellen analog zu *in vitro* hergestellten Tregs nach Nb/OVA-Infektion an Tag 7 analysiert. Dargestellte Wolken- (B) bzw. Balkendiagramme (C) zeigen 3 Mäuse aus 2 unabhängigen Experimenten.

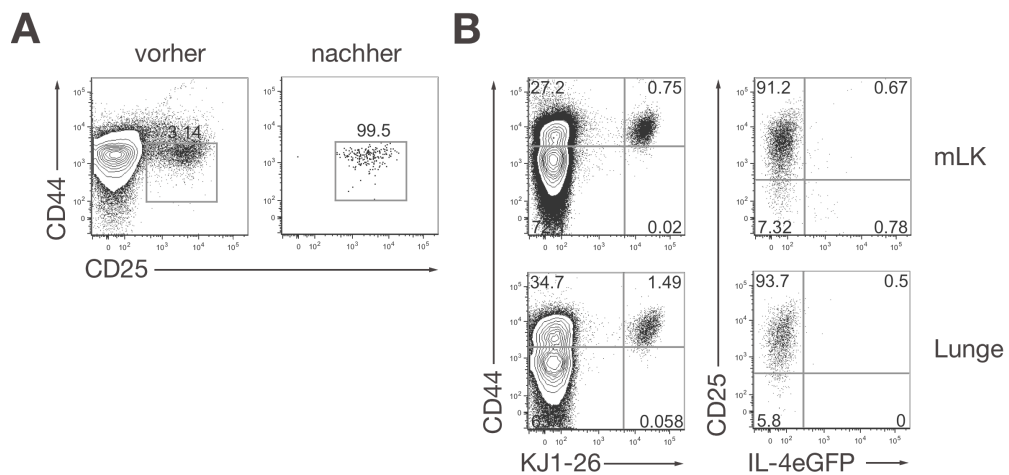


Abbildung 14. Ex vivo isolierte, natürliche regulatorische T-Zellen aus IL-4eGFP-Reportermäusen zeigen keine Plastizität nach adoptivem Transfer und Nb/OVA-Infektion auf.

(A) Isolierung von natürlichen Tregs ($CD4^+KJ1-26^+IL-4eGFP^+CD25^+CD44^+$) aus der Milz und Lymphknoten von DO11.10-4get-CD90.1 Mäusen. Dargestellt sind $CD4^+KJ1-26^+IL-4eGFP^+$ Zellen vor und nach der FAC-Sortierung. Die IL-4-Expression von transferierten Tregs wurde nach Nb/OVA-Infektion durch die direkte durchflusszytometrische IL-4eGFP-Analyse 6 Tage nach der Infektion überprüft (B). Die linken Konturen-Wolkendiagramme zeigen lebende Lymphozyten der Lunge und mLN bzw. rechte Wolkendiagramme $CD4^+KJ1-26^+$ Spenderzellen. Exemplarisch ist eine von zwei Empfängermäusen, mit dem gleichen Ergebnis, gezeigt.

In Anbetracht der Resultate kann abschließend eine IL-4-Expression sowohl von *in vitro* differenzierten als auch *ex vivo* isolierten Treg-Zellen während der akuten Phase einer *N. brasiliensis*-Infektion weitgehend ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnten beide Ausgangspopulationen in ihrer Plastizität als resistente und stabile Zellen gegenüber der Th2-Repolarisierung charakterisiert werden.

Abschließend ist das Markerzytokin- und Transkriptionsfaktorprofil der untersuchten Th1-, Th17- und Treg-Zellen graphisch anhand von Kuchendiagrammen zusammenfassend dargestellt. Die Frequenzen der repolarisierten, stabilen bzw. kein Zytokin exprimierenden Spenderzellen in den mLK an Tag 6 nach der erfolgten Nb/OVA-Infektion verdeutlichen die Effizienz der unterschiedlichen Ausgangspopulationen während einer induzierten Typ2-Immunantwort repolarisiert zu werden.

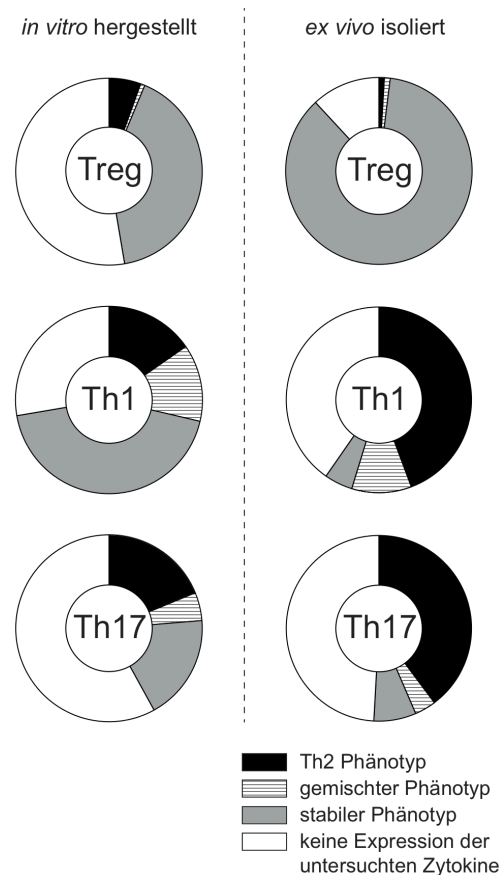


Abbildung 15. Effizienz der *N. brasiliensis*/OVA induzierten Th2-Repolarisierung von Th1, Th17 und Treg-Zellen. Zytokin-/Transkriptionsfaktorprofil von *in vitro* hergestellten (links) oder *ex vivo* isolierten (rechts) Treg, Th1 und Th17-Zellen im mLK nach dem adoptivem Transfer und Infektion der Empfängermäuse mit einem *N. brasiliensis*/OVA-Gemisch. Das Diagramm zeigt die Fraktionen von Spenderzellen die resistent gegenüber der Th2-Repolarisierung waren und anhaltend das entsprechende Markerzytokin bzw. den Markertranskriptionsfaktor exprimierten (grau). Zellen die ihren ursprünglichen Phänotyp verloren und zu IL-4 produzierenden Th2-Zellen differenzierten sind in schwarz, Zellen mit einem gemischten, doppelten Phänotyp liniert und Zellen ohne die Expression eines der untersuchten Zytokine oder Transkriptionsfaktoren in weiß dargestellt.

Modulation autoimmuner Mausmodelle durch eine *Nippostrongylus-brasiliensis*-Parasiteninfektion

Helminthparasiten besitzen eine starke immunregulatorische Funktion, um ihr Überleben in den Wirten zu sichern. Diese gezielte Immunmodulation wird vermutlich durch Unterdrücken von Entzündungsreaktionen erreicht, so dass sich die Wurmlarven erfolgreich durch die Eindämmung der Immunreaktion bis zur Fortpflanzungsreife entwickeln können (Maizels et al., 2003). Die Modulation und Induktion des Immunsystems durch den Parasiten kann jedoch paradoxerweise auch in einer Milderung oder einem Schutz vor autoimmunen und allergischen Erkrankungen resultieren und wurde bislang nur für vereinzelte Arten beschrieben. Ein möglicher zu Grunde liegender Mechanismus könnte die Repolarisierung von autoreaktiven T-Effektorzellen durch den Parasiten sein. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse solch einer Konvertierung und Redifferenzierung von Th1- und Th17-Zellen hin zu Th2-Zellen zeigen, dass dies *in vivo* grundsätzlich durch die induzierte und gegen den Helminthen *N. brasiliensis* gerichtete Th2-Immunantwort möglich ist. Um zu verifizieren, ob die Repolarisierung ein vermeintlicher Mechanismus der Modulation von Autoimmunität ist und repolarisierte Th2-Zellen eine protektive Funktion ausüben können, wurden zwei verschiedene autoimmune Mausmodelle etabliert. Dabei wurde versucht durch Infektion mit dem Parasiten *N. brasiliensis* das Immunsystem zu modulieren und den Krankheitsverlauf abzumildern.

Modulation einer experimentell induzierten Encephalomyelitis

In der MS-Grundlagenforschung ist die experimentell induzierte autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ein häufig genutztes Ratten- sowie Mausmodell, welches im Bezug auf die Wirkungsweise autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen einige Ähnlichkeiten zur Multiplen Sklerose zeigt. Die Induktion des aktiven EAE-Mausmodells wurde in dieser Arbeit durch eine direkte Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit einer Emulsion von CFA, hitze-inaktivierten *Mycobacterium tuberculosis*-Erregern und dem eigentlichen Neuroantigen MOG₃₅₋₅₅ erzielt. Man vermutet, dass die Induktion einer Th1- und Th17-Differenzierung den Beginn einer Immunantwort gegen das myeline Protein der Nervenzellen einleitet.

Der Krankheitsverlauf der Mäuse wurde über mehrere Wochen verfolgt und die auftretenden Symptome, Dia- bis hin zur Tetraparesen in ihrer Schwere durch ein Zahlensystem klassifiziert (Abb. 16A). Beginnend mit Tag 10 nach Immunisierung konnte zunächst ein synchroner Verlauf der Erkrankung beobachtet werden. Der weitere Verlauf stellte sich hingegen als sehr heterogen dar, was möglicherweise auf die suboptimalen Hygienebedingungen im Tierstall zurückzuführen war. Um dennoch einen Effekt durch den Helminthen *N. brasiliensis* zu

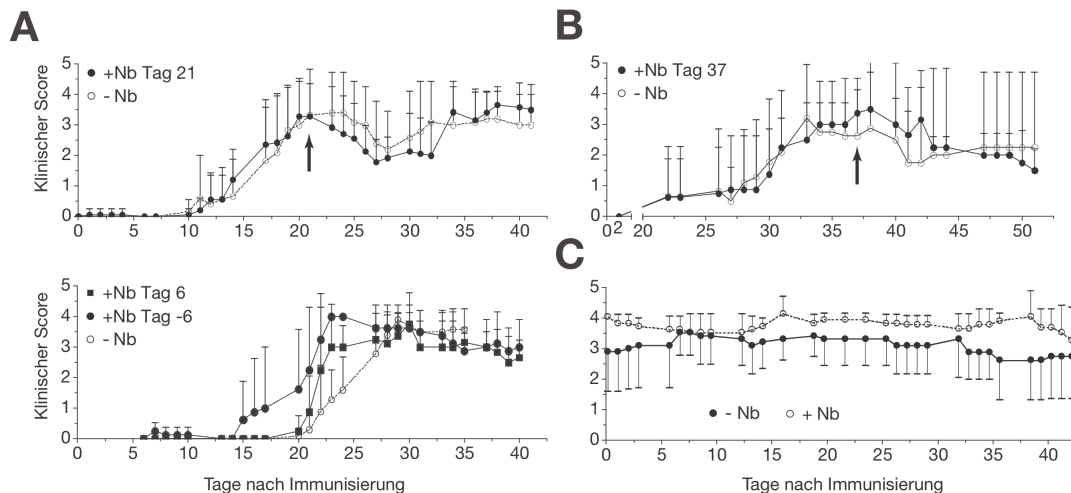


Abbildung 16. Untersuchung der Autoimmunmodulation in verschiedenen EAE-Mausmodellen durch eine *N. brasiliensis* Infektion.

(A) Modulation von experimentell induzierter Encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6-Mäusen durch *N. brasiliensis* (+Nb) im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (-Nb). Die Induktion von EAE erfolgte durch aktive Immunisierung mit dem Peptid MOG₃₅₋₅₅ in CFA (200 µg/Maus) und zweimaliger Pertussistoxin-Gabe i.p. (je 200 ng). Mäuse wurden während der akuten Krankheitsphase an Tag 21 (oben) bzw. 6 Tage zuvor oder am Tag der Immunisierung (unten) infiziert. Der Mittelwert des klinischen Scores (+SD) ist dargestellt. n= 4 (oben) bzw. 5 Mäuse/Gruppe (unten). (B) Immunmodulation durch Nb-Infektion in durch T-Zelltransfer erkrankten EAE-Mäusen (Transfer EAE-Modell). MOG-spezifische Th1 und Th17-Zellen wurden *in vitro* von Milzzellen aus 2D2-Mäusen hergestellt und 9-10⁷ Zellen wurden pro Rag2^{-/-} Empfängermaus (C75BL/6) transferiert. Mittelwert (+SD) n=4-6 Mäuse/Gruppe. Vergleichbare Ergebnisse wurden aus zwei weiteren Experimenten mit insgesamt 5 bzw. 14 Mäusen erzielt. (C) Exemplarische Darstellung von Nb-infizierten und naiven 2D2/Th-Mäusen, die spontan an EAE erkrankten. Dargestellt sind je 5 Mäuse die an Tag 0 eine Klassifizierung von 2-4 aufwiesen. Ein vergleichbares Ergebnis konnte in weiteren Experimenten beobachtet werden. Insgesamt wurden >100 Nachkommen der 2D2-Th-Mauslinie untersucht. Die Inzidenz betrug für männliche 31% und weibliche Tiere 52%. Die klinische Beurteilung aller EAE-Modelle erfolgte nach folgenden Kriterien: 0= keine Erkrankung; 1= geschwächter Schwanztonus; 2= Bewegungseinschränkungen der hinteren Gliedmaßen oder Paralyse; 3= vollständige Paralyse der hinteren Extremitäten (Diaparese); 4= Tetraparese; 5= moribunder Status.

untersuchen, wurde eine zweite Gruppe parallel mit dem Wurmparasiten an Tag 21, dem Höhepunkt des Krankheitsverlaufs, infiziert. Eine eindeutige Modulation der EAE konnte anhand der zusammengefassten Darstellung der Versuchsgruppen nicht beobachtet werden (Abb. 16A, oben). Aus diesem Grund wurde der Einfluss zweier weiterer Infektionszeitpunkte an Tag 6 vor und nach der Immunisierung getestet (Abb.16A, unten). Der untere Graph zeigt die Pathogenese anhand des Klassifizierungssystems in drei verschiedenen Mausgruppen. Im Vergleich zum zuvor beschriebenen Experiment wird die Variabilität des frühen Krankheitsverlaufs deutlich. Der Beginn der Symptome war zwischen dem 15.-20. Tag zu beobachten, wodurch keine allgemeingültige und vergleichbare Aussage zu treffen war. Es konnte keine positive Modulation des EAE-Verlaufs festgestellt werden. Die akute Phase der Nb-Infektion schien darüber hinaus das Fortschreiten der Erkrankung und die Symptome zu verstärken. Aus den genannten Gründen wurde daher auf weitere Experimente mit dem aktiven EAE-Mausmodell verzichtet und ein alternatives EAE-Modell untersucht.

Der Transfer von neuroantigen-spezifischen Th1- und Th17-Zellen in Empfängerermäuse

kennzeichnet eine Variante des passiven EAE-Modells. Die Differenzierung dieser autoreaktiven Zellen ist ausgehend von Milzzellen aus 2D2-Mäusen unter neutralen, Kulturbedingungen *in vitro* erzielt worden. Durch die Verwendung dieser Mauslinie, die transgen für einen MOG₃₅₋₅₅ spezifischen TZR ist, konnten sowohl Myelin-reaktive Th1-Zellen als auch eine kleinere Anzahl an Th17-Zellen *in vitro* gewonnen werden. Der Transfer von $0.5-1 \times 10^7$ Th1- und Th17-Zellen in lymphopene Rag2^{-/-}-Mäuse resultierte in einem im Vergleich zum aktiven EAE-Modell milden Krankheitsverlauf (Abb. 16B). Lediglich in einzelnen Versuchstieren zeigte sich eine transiente und leichte Besserung der Hinterbein-Paralyse etwa 1-2 Tage nach Infektion mit *N. brasiliensis*. Allerdings konnte insgesamt kein signifikanter Effekt durch eine Infektion an Tag 37 nach T-Zelltransfer festgestellt werden. Dies lag zum einen an der starken Variation der Pathogenese und zum anderen an einer nur sporadisch auftretenden Modulation der Symptome durch die Helmintheninfektion. Weitere Transferexperimente mit 2D2-Zellen in immunkompetente C57BL/6-Mäuse induzierten wider Erwarten keine EAE (Daten nicht gezeigt).

Parallel wurden Nachkommen der Mauslinie 2D2-Th auf ihre spontane EAE-Erkrankung hin untersucht. Mäuse dieses Stammes weisen sowohl autoimmune B- als auch T-Zellen gegen das myeline Glykoprotein MOG auf und können daher eine EAE spontan induzieren (Bettelli et al., 2006a; Krishnamoorthy et al., 2006). Die Auswertung von mehr als 100 Nachkommen ergab eine Inzidenz von 31%, wobei weibliche Mäuse im Gegensatz zu männlichen Tieren etwas häufiger erkrankten (52%). Die ersten Anzeichen der Pathogenese konnten bereits in 4-6 Wochen alten Nachkommen festgestellt werden. Allerdings variierte der Zeitpunkt des Krankheitsbeginns sowie die Stärke der Symptome ebenfalls sehr stark. Wir beschlossen daher nur bereits erkrankte Tiere, welche eine Klassifizierung zwischen 2 und 4 aufwiesen, mit dem Parasiten zu behandeln. Eine Milderung der Pathogenese durch *N. brasiliensis* war in diesem EAE-Mausmodell ebenfalls nicht zu beobachten (Abb. 16C).

Neben vereinzelt Mäusen die eine klare Verbesserung der Krankheitssymptome einen Tag nach der Parasiteninfektion und anhaltend bis zu einer Woche zeigten, konnte kein eindeutiger und signifikanter Effekt durch die Parasiten-gerichtete Typ-2-Immunantwort nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Tiermodell getestet.

Modulation einer durch CD4-T-Zelltransfer induzierten Colitis

Eine experimentelle Transfercolitis im Mausmodell weist in ihren Symptomen und der Pathogenese sowohl Merkmale einer UC- als auch einer MC-Erkrankung beim Menschen auf. Wie einleitend in dieser Arbeit beschrieben ist das Tiermodell jedoch wie bei MC-Patienten von einer Infiltration der Lamina propria durch pathogene Th1- und Th17-Zellen dominiert (Ahern et al., 2010; Elson et al., 2007). Eine Entzündung des Kolons im Tiermodell kann durch einen

Transfer von naiven CD4⁺ Zellen in lymphopenische Empfängermäuse und vermutlich durch deren rasche homeostatische Expansion und IFN- γ -Produktion induziert werden. Symptomatisch äußert sich diese Entzündung des Kolons durch einen starken Gewichtsverlust, Diarrhoe oder einem Analprolaps und kann innerhalb weniger Wochen zum Tod des Versuchstiers führen. Für die Induktion der Erkrankung wurden aufgereinigte CD4-positive T-Zellen des BALB/c- oder C57BL/6-Mausstamms in lymphopenische Rag2^{-/-}-Mäuse des entsprechenden genetischen Hintergrunds transferiert (Abb. 17). Ein Transfer der Zellen in lymphopenische Empfängertiere des BALB/c-Hintergrunds führte zu einem starken Gewichtsverlust, der nach etwa einer Woche einsetzte und über die darauffolgenden 18 Tage andauerte. Um die Entstehung der Colitis zu hindern wurde eine weitere Gruppe von Mäusen am Tag des T-Zelltransfers mit Wurmparasiten-Larven subkutan infiziert. In der akuten Phase dieser Infektion war zunächst ein drastischer Abfall des Gewichts innerhalb dieser Gruppe zu beobachten, der sich aber innerhalb weniger Tage relativierte und zunächst über eine weitere Woche stagnierte. Erst nach diesem Zeitraum konnte das Fortschreiten der Colitis anhand des erneuten Gewichtsabfalls festgestellt werden (Abb. 17A). Folglich wurde in weiteren Experimenten versucht die expandierten Spenderzellen und damit die Entzündung zu einem späteren Zeitpunkt zu modulieren. Die Abbildung 17B zeigt diese Transferexperimente und die Induktion innerhalb von Mäusen des C57BL/6-Hintergrunds. Im Vergleich zum Transfer in BALB/c-Mäuse stellte sich der Fortschritt der Colitis in C57BL/6-Mäusen durch eine raschere Gewichtsabnahme schneller dar. Wider Erwarten führte die Parasiteninfektion der Vergleichsgruppe an Tag 0 zu einem stärkeren protektiven Effekt ohne eine vorherige Abnahme des Gewichts. Mäuse dieser Gruppe erreichten im Gegensatz zu naiven nicht-infizierten Mäusen einen 20%igen Körpergewichtsverlust erst an Tag 31 und nicht an Tag 18. Die Infektion von Empfängertieren 7 Tage nach Transfer zeigte hingegen zunächst eine nur kurze

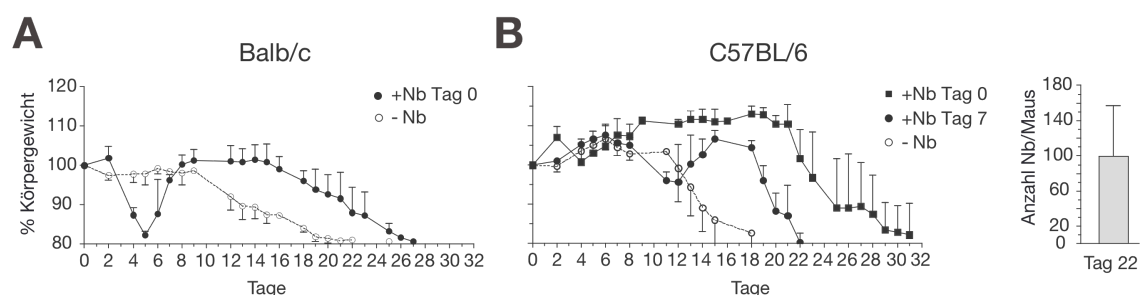


Abbildung 17. Transiente Modulation einer T-Zelltransfer-Colitis durch eine *N.-brasiliensis*-Infektion.

Die Induktion von Colitis in Rag2^{-/-} Mäusen wurde durch Transfer von 10⁵ MACS-sortierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen erzielt. (A) Prozentuales Körpergewicht nach T-Zelltransfer in 4get-Rag2^{-/-} Empfängermäuse (BALB/c). An Tag 0 wurden 500 L₃-Larven des Parasiten *N. brasiliensis* (Nb) s.c. injiziert. Dargestellt ist der Mittelwert (+SD) von 3 Mäusen/Gruppe. (B) Wie (A) jedoch wurden C57BL/6 CD4⁺ T-Zellen in RAG^{-/-} C57BL/6-Empfängermäuse transferiert (n=3-5 Mäuse/Gruppe) und zwei Gruppen an Tag 0 bzw. 7 mit Nb infiziert. An Tag 22 wurde die Gruppe „+Nb Tag 7“ aufgrund des hohen Gewichtsverlust aus dem Versuch genommen und adulte Wurmparasiten im Darm gezählt (B, rechts).

transiente Reduktion des Gewichts. Im weiteren Verlauf zeigte sich allerdings ein schneller progressiver Gewichtsverlust trotz der anhaltend hohen Anzahl an Würmern im Dünndarm.

So konnte durch Infektion mit *N. brasiliensis* lediglich eine transiente Verzögerung der Colitis-induzierten Gewichtsabnahme erzielt werden. Eine vollständige Therapie und Genesung der Mäuse war unabhängig vom Infektionszeitpunkt nicht zu beobachten.

6 Diskussion

Eine Infektion mit gastrointestinalen Wurmparasiten führt zu einer Induktion und Aktivierung von Zellen des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems. Diese parasitengerichtete Immunantwort ist aus einer vermutlich langen Koevolution zwischen Parasiten und ihrem Wirt hervorgegangen, was durch ein komplexes bisher nicht verstandenes Zusammenspiel von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, alternativ-aktivierten Makrophagen sowie Th2-Zellen reflektiert wird. Diese umfangreiche Typ-2-Immunantwort kann jedoch widersprüchlicher Weise bei einer simultan vorliegenden allergischen oder autoimmunen Erkrankung im Menschen, die entgegengesetzt durch eine autoreaktive Typ-1-Immunantwort gekennzeichnet ist, zu einer Milderung der Pathogenese führen. Aus diesem Grund stellt die Verschiebung von entzündlichen autoreaktiven Immunantworten in Richtung einer protektiven Typ-2-Immunantwort durch eine gezielte Parasiteninfektion einen zunehmend intensiv erforschten Therapieansatz dar. Aktuelle Erkenntnisse zur Plastizität von CD4⁺ Effektorzellen rücken als einen zugrunde liegenden Mechanismus die Repolarisierung autoreaktiver Th1 oder Th17-Zellen hin zu protektiven Th2-Zellen durch die Parasiten-eingeleitete Immunantwort in das wissenschaftliche Interesse. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Plastizität von CD4-positiven Effektorzellsubtypen anhand des vorgestellten Helminthen- und adoptiven Zelltransfermodells *in vivo* untersucht. Für die beiden Th-Subtypen 1 und 17, die durch ihre Rolle und Beteiligung an autoimmunen Erkrankungen bedeutsam sind, konnte erstmals eine Konvertierung in den T-Helferzelltyp 2 *in vivo* beobachtet werden. Eine vollständige Redifferenzierung definierte sich durch den Verlust der Markerzytokine IFN- γ und IL-17A und deren Expression des für Th2-Zellen charakteristischen Zytokins IL-4. Darüber hinaus konnte die Flexibilität der Helferzellen sowohl ausgehend von *in vitro* als auch *in vivo* differenzierten, monoklonalen Ausgangspopulationen erstmals beschrieben werden. Regulatorische T-Zellen teilten diese Flexibilität jedoch nicht und stellten im Gegenteil einen stabilen nicht modulierbaren Subtyp dar.

Ursprünglich beschrieben klassische Hypothesen die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen als einen dichotomen Prozess der zu terminal ausdifferenzierten Zellsubtypen, die sich durch eine reziproke Regulation ausschließen, führt (Mosmann et al., 1986). Diese Annahmen fundierten auf der Beobachtung von *in vitro* hergestellten Th1- und Th2-Zellklonen die in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an polarisierenden Zytokinen differenziert wurden. Frühere Daten zeigten bereits die Kultivierung von Th1- und Th2-Zellen unter entsprechenden Typ1- bzw. Typ2-polarisierenden Bedingungen und deuteten eine vermeintliche Reprogrammierung von nur kurzzeitig kultivierten Zellen an. Dies konnte jedoch in Zellen die 3-

4 Zelldifferenzierungszyklen durchliefen nicht mehr beobachtet werden (Grogan et al., 2002; Murphy et al., 1996). Mit der Entdeckung der in der Einleitung beschriebenen Th17- und Treg-Zellen sowie der vereinzelt beschriebenen Expression typfremder Markerzytokine *in vitro*, kann das dichotome Differenzierungsmodell als Grundlage der Th-Subtypendifferenzierung nicht mehr verwendet werden. Das bisherige Verständnis der Plastizität von CD4⁺ Effektorzellen basiert zu einem großen Teil auf Daten, die ebenso wie die Entwicklung des dichotomen Modells, auf Beobachtungen von *in vitro* differenzierten Subtypen gemacht wurden. Bisher konnte diese Plastizität jedoch nur vereinzelt durch die Expression typfremder Markerzytokine wie der IFN- γ -Expression in Th2-Zellen in einem Virusmodell (Hegazy et al., 2010), der IL-17/ROR γ t-Expression in Th2-Zellen in einem Asthma-Mausmodell (Wang et al., 2010) oder autoreaktiver Zellen eines gemischten Th1/17-Phänotyps in MS-Patienten (Annunziato et al., 2007; Kebir et al., 2009; McGeachy et al., 2007) *in vivo* gefunden werden. Die Flexibilität von Treg-, Th1- und Th17-Zellen war, bis auf die bislang *in vitro* ermittelten Erkenntnisse, die allerdings nur teilweise das Zytokin-Milieu einer Immunantwort *in vivo* widerspiegeln, unklar. Für die Untersuchung der Effektorzellplastizität war es daher wichtig ein physiologisches Parasiten- und antigenspezifisches Zelltransfermausmodell zu entwickeln, das die Untersuchung der beschriebenen Beobachtungen zur Plastizität unter physiologischen Bedingungen *in vivo* ermöglichte. Eine Infektion mit dem Helminthen *Nippostrongylus brasiliensis* erwies sich als geeignet, da nur in den betroffenen Organen und beteiligten Lymphknoten ausschließlich T-Helferzellen des Typs 2 und keine weiteren Subtypen induziert wurden. Die direkte Parasiteninfektion von Mäusen resultierte lediglich in einer marginalen Induktion von regulatorischen T-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten, die aber wie durch adoptiven Transfer von naiven Zellen gezeigt wurde, nicht *de novo* entstehen, sondern vielmehr rekrutiert werden. Durch die Verwendung von OVA-spezifischen, monoklonalen Spenderzellpopulationen aus IL-4-Reportermäusen und der Infektion der Empfängertiere mit einem Nb/OVA-Gemisch konnte eine antigenabhängige Expansion *in vivo* und eine Repolarisierung der Ausgangspopulationen hin zu Th2-Zellen dargestellt werden. Das Reportergen eGFP ermöglichte den direkten Nachweis von physiologischen IL-4 Produzenten. Im Vergleich zum vorherigen Transfer von naiven Spenderzellen wurde zudem die Effizienz und Stärke des Modells, Zellen ausschließlich in den Typ 2 zu differenzieren, verdeutlicht. In diesem Kontext war es möglich, eine bemerkenswert schnelle und vollständige Repolarisierung von Th1- und Th17-Spenderzellen zu beobachten und deren Flexibilität *in vivo* darzustellen. In beiden Situationen wurden die Zellen zuvor sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für 6 bzw. für *ex vivo* isolierte Th17-Zellen für 3 Tage stimuliert und anschließend basierend auf ihrer Zytokinsekretion isoliert. Die Verwendung von Zytokinsekretionskits anstelle von Zytokinreportermäusen ermöglichte dabei die Identifizierung und Isolierung von Zellen, die das Zytokinprotein tatsächlich sekretierten. In Zellen von Zytokinreportermäusen kann das

Reportergen möglicherweise nicht immer die Proteinexpression anzeigen, da die genetischen Veränderungen des Zytokingens oft die mRNA- oder Proteinstabilität beeinflussen (Croxford et al., 2011). Der verwendete IL-4-Reportermausstamm „4get“ hingegen ist ausreichend, um Th2-Zellen zu markieren, obwohl eine Zytokinproteinexpression einer weiteren Stimulation und Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 α bedarf (Scheu et al., 2006). Das Signal des bicistronisch-nachgeschalteten eGFP korrelierte dennoch mit der Menge an sekretiertem IL-4, was durch einen dualen Antikörper des IL-4-Sekretionskits gegen IL-4 einerseits und die T-Zelloberfläche andererseits nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

Der *IFNG* Locus vollzieht zur Öffnung in differenzierenden Th1-Zellen mehrere epigenetische Modifikationen, wie DNA-Demethylierungen, die mit aktiven Promotoren assoziiert sind, bis hin zu aktiven Histonmodifikationen, wie der Histon-H3-Acetylierung und Trimethyl-Histone-H3-Lysin4 (H3K4me3). Th2-Zellen zeigen hingegen repressive Histonmodifikationsmuster am *IFNG* Locus, was DNA-Methylierungen und Trimethylierung des Lysin 27 von Histon H3 (H3K27me3) umfasst und so die Transkription des Typ-fremden Faktors verhindert (Janson et al., 2011; Wilson et al., 2009). Ähnliche epigenetische Regulationsmechanismen betreffen auch die beiden Gene der Markertranskriptionsfaktoren *TBX21* und *GATA3*, was die grundsätzliche, reziproke Regulation von Th1- und Th2-Zellen repräsentiert. T-bet und der Repressor Runx3 können an den IL-4-Promotor bzw. an DNase I-hypersensitive Stellen des IL-4/IL-13-Lokus binden und so die IL-4-Expression in Th1-Zellen blockieren (Djuretic et al., 2007). Dem Faktor T-bet ist es des Weiteren möglich, durch die eigene Phosphorylierung ausgehend von Itk (*IL2-inducible T-cell kinase*) die Funktion des Th2-einleitenden Faktors GATA3 zu inhibieren (Hwang et al., 2005). Obwohl die bisher bekannten Mechanismen eine Induktion des Th2-Phänotyps in Th1-Zellen verhindern und den Th1-Typ stabilisieren sollten, konnte in dieser Arbeit die schnelle und effiziente Repolarisierung von *in vitro* und *ex vivo* gewonnenen Th1-Zellen unter dem Einfluss der Helmintheninfektion beobachtet werden. Neben einer Population an Spenderzellen, die sowohl eine anhaltende IFN- γ - als auch eine IL-4-Expression aufwiesen und einen potenziellen Zwischenschritt der Repolarisierung hin zu Th2-Zellen darstellen könnten, wurden vollständig konvertierte Th2- vormalig Th1-Zellen gefunden. Das Zytokinexpressionsprofil wurde direkt durch die analysierten T-bet- und Gata3-mRNA-Level reflektiert. Trotz der verbleibenden aber geringen Anwesenheit von T-bet in IL-4eGFP⁺IFN- γ ⁻ Zellen konnten höhere Gata3 mRNA-Level anhand einer semi-quantitativen PCR nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Überwindung der T-bet vermittelten Blockierung des IL-4/IL-13-Lokus. Eine direkte oder indirekte Beteiligung daran durch Gata3 selbst ist bisher nicht bekannt. Jedoch weiß man, dass sich Gata3 selbst durch eine positive Rückkopplungsschleife regulieren und die Entwicklung von Th1-Zellen durch die Repression der IL-12-Rezeptor β 2-Kette hemmen kann (Zhou et al., 2003). Aus diesem Grund wären für weitere Rückschlüsse, Untersuchungen bezüglich der IL-12-Rezeptorexpression interessant.

Darüber hinaus konnte durch einen Transfer von Spenderzellen in IL-4/IL-13-defiziente Empfängerermäuse gezeigt werden, dass die beobachtete Repolarisierung teilweise unabhängig von exogenem IL-4 verläuft. Da die initiale Gata3-Expression durch den IL-4-Zytokinrezeptor induziert wird und STAT6 abhängig ist, könnte ein weiterer zusätzlicher Signalweg in dem Repolarisierungsprozess eine Rolle spielen. Möglicherweise könnten bereits in der Th2-Differenzierung bekannte Zytokinrezeptor-gekoppelte STAT5-Signale, welche die Anwesenheit von Gata3 nicht induzieren können, aber benötigen, vermitteln (Zhu et al., 2006). Ein weiterer Weg die IL-4-Expression unabhängig von IL-4 und STAT6 einzuleiten, könnte durch Notch-Rezeptorsignalwege erzielt werden. Während das Mitglied der Notch-Familie Delta, Th1-Zellen induziert, resultiert die Bindung von Jagged an dem Rezeptor in einer Translokation von Notch in den Nukleus. Dort kann es neben der Regulation der IL-4-Transkription durch die Bindung an der 3'-UTR des Zytokins, auch eine direkte Induktion von GATA3 induzieren (Amsen et al., 2007; Amsen et al., 2004). Eine Klärung der Frage nach alternativen IL-4-unabhängigen Signalwegen, die zu einer Th2-Repolarisierung führen, muss daher durch weitere Transferexperimente von Zellen aus Notch- oder verschiedener Zytokinrezeptor-defizienter Mäuse beantwortet werden.

Die Flexibilität von Th1-Zellen weist durch ihre zentrale Rolle in autoimmunen Erkrankungen, ein enormes Potential für Therapien auf. Inwieweit die hier beschriebenen Beobachtungen in der Maus allerdings auch auf humane Th1-Zellen zutreffen, muss in Zukunft noch untersucht werden. Zwar ist bekannt, dass autoreaktive Zellen in MS-Patienten, wie beschrieben, sowohl IFN- γ als auch IL-17 exprimieren können, doch scheinen größere Erwartungen durch aktuelle Daten bisher verfrüht. Cohen et al. konnten anhand einer vergleichenden Untersuchung von humanen *in vivo* differenzierten Th1 und Th17-Zellen zeigen, dass eine *in vitro* Kultivierung unter entgegengesetzt polarisierenden Bedingungen zwar in der Expression des jeweilig anderen Markerzytokins resultiert, aber nicht die vollständige Repolarisierung und den Verlust der IFN- γ - bzw. IL-17-Expression in Th1 und Th17-Zellen zur Folge hat (Cohen et al., 2011). Des Weiteren korrelierte zwar die Expression der entsprechenden Transkriptionsfaktorgene *TBX21*, *RORC* oder *RORA* und es konnten simultane Expressionen typfremder Faktoren gefunden werden, doch zeigten die epigenetischen Modifikationen über den entsprechenden Loci wenig Flexibilität. Durch die bereits diskutierten limitierenden Fähigkeiten von *in vitro* Kulturen das *in vivo* Milieu und komplexe Immunantworten darzustellen, bleibt die Frage nach dem Repolarisierungspotential von humanen Th1- und Th17-Zellen *in vivo* jedoch offen. In dem hier vorgestellten Modell zeigten *in vivo* differenzierte Th1 und Th17-Spenderzellen ein höheres Maß an Flexibilität in den IL-4-produzierenden Th2-Subtyp zu redifferenzieren als unter Zellkulturbedingungen polarisierte Ausgangspopulationen. Dies unterstreicht zusätzlich die Bedeutung des etablierten physiologischen *N. brasiliensis*/Transfermodells und einer Untersuchung der Plastizität *in vivo*.

Th17 sind ursprünglich als IL-17-sekretierende Th-Zellen beschrieben und, da sie keine weiteren Zytokine anderer Subtypen exprimierten, einem neuen Subtypen zugeordnet worden (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005). Unter dem Einfluss der untersuchten *N.-brasiliensis*-Infektion konnte die Repolarisierung dieses Typs erstmals in Th2-Zellen *in vivo* beobachtet werden. Darüber hinaus stellten sich sowohl *in vitro* hergestellte als auch *ex vivo* isolierte Th17-Spenderzelle durch den höheren Anteil an vollständig polarisierten Th2-Zellen flexibler als Th1-Zellen dar. Dieses hohe Maß an Flexibilität ist auch durch die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die jedoch weitgehend die Möglichkeit von Th17-Zellen beschreiben Th1- oder Treg-spezifische, aber nicht Th2-spezifische Zytokine bzw. Transkriptionsfaktoren zu exprimieren, reflektiert. So konnte bislang gezeigt werden, dass Th17-Zellen nach dem Transfer und homeostatischer Expansion in lymphopenischen Mäusen sowie anhand von aufgereinigten Zellen aus IL-17F-Reportermäusen, *in vitro* beginnen können das Zytokin IFN- γ und den entsprechenden Th1-Transkriptionsfaktor T-bet zu exprimieren (Bending et al., 2009; Lee et al., 2009; Shi et al., 2008). In Untersuchungen von Mausmodellen für eine *Candida albicans*-Infektion sowie für experimentelle autoimmune Uveitis konnte zudem durch die Identifikation von Th17-Zellen, die IFN- γ produzierten, eine physiologisch bedeutsame Rolle des gemischten T-Helferzellphänotyps *in vivo* zugesprochen werden (Hirota et al., 2011; Shi et al., 2008). Desweiteren ist das gleichzeitige Vorhandensein von ROR γ t- und T-bet-doppelpositiven Zellen in murinen EAE-Mausmodellen bereits beschrieben worden (Ghoreschi et al., 2010). T-bet blockiert, neben Gata3, auch in einer Runx1-abhängigen Weise den Faktor ROR γ t (Lazarevic et al., 2011), was ebenso zur Annahme veranlasste, dass sich eine gleichzeitige Expression der Markertranskriptionsfaktoren T-bet und ROR γ t ausschließt. Vielmehr scheinen jedoch die aktuellen Beobachtungen von Zellen mit einem doppelten Transkriptionsfaktor-Phänotyp eine reale *in vivo* Situation zu reflektieren. Dies lässt eine übergeordnete, bisher unbekannte Regulation der Transkriptionsfaktoren vermuten.

Im Vergleich zu den vielen Hinweisen einer möglichen Repolarisierung von Th17- hin zu Th1-Zellen sind bis auf die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen, kaum Hinweise einer möglichen Redifferenzierung in die Richtung des Typs 2 bekannt. Ausschließlich Wang et al. beschrieben in einem murinen Asthmadmodell IL-17-positive Th2-Zellen, die sowohl beide Haupttranskriptionsfaktoren GATA3 als auch ROR γ t exprimierten (Wang et al., 2010). Dies ist umso bemerkenswerter, da beide Subtypen von einer Beteiligung des Interferon-regulierenden Faktors 4 (IRF4) abzuhängen scheinen. Während IRF4 hauptsächlich in der späteren Entwicklung von Th2-Zellen für die Regulation von Th2-Zytokinen wichtig erscheint (Honma et al., 2008), ist IRF4 in Th17-Zellen durch den Faktor STAT3 reguliert und eine IRF4-Defizienz blockiert die Differenzierung dieses Th-Subtyps (Brustle et al., 2007). Inwieweit diese Subtypen in ihrer Regulation jedoch durch den Faktor IRF4 überlappen könnten, ist bisher anhand der wenig gesammelten Erkenntnisse nicht klar und bedarf weiterer Erforschung. Der Beginn einer

Th2-Differenzierung von Th17-Zellen könnte aber, ähnlich wie bereits in Th1-Zellen diskutiert, über die Beteiligung von IL-2 über STAT5-vermittelte Signale erreicht werden. Es scheint, dass eine Abschaltung der Th17-Zytokine durch die Aktivierung von STAT5 über den gekoppelten IL-2-Zytokinrezeptor und der damit verbundenen Konkurrenz um die Bindung an Verstärkerelemente des *Il17a-Il17f*-Lokus mit STAT3 möglich ist (Hirahara et al., 2011). Die verstärkten STAT5-Signale über IL-2 könnten somit nach der Abschaltung der Th17-Zytokine wieder über diesen IL-4-unabhängigen Signalweg zusammen mit IL-4 induzierenden Signalen über STAT5 und STAT6 die Th2-Differenzierung einleiten. Neben der postulierten inhibierenden Wirkung von STAT5 auf Th17-Zellen ist eine weitere Rolle des Faktors in der überlappenden Differenzierung von Treg-Zellen bekannt und vermutlich reguliert eine Balance zwischen STAT3 und STAT5 die Differenzierung hin zu Treg oder Th17-Zellen (Adamson et al., 2009). Im Gegensatz zu den eng verwandten Th17-Zellen ist die Flexibilität dieses immunsupprimierenden Subtyps im Menschen weitgehend unklar, da die Identifikation von Treg-Zellen durch das Fehlen spezifischer Marker erschwert ist. Im Gegensatz zur Maus stellt der humane Transkriptionsfaktor Foxp3 keinen verlässlichen Marker dar und scheint auch in aktivierten T-Zellen unabhängig der suppressierenden Eigenschaften induziert zu sein (Miyara et al., 2009). Im Mausmodell existieren hingegen zahlreiche zum Teil widersprüchliche Daten zur Stabilität des Treg-Subtyps. Eine Untersuchung der Plastizität während einer Typ2-gerichteten Immunantwort ist jedoch bisher nicht bekannt. Deswegen ist die Darstellung von Foxp3-exprimierenden Treg-Zellen in dieser Arbeit als gegenüber der Helmintheninfektion resistenter Subtyp von besonderer Bedeutung. Während ein Teil der *in vitro* differenzierten iTreg-Zellen noch eine gewisse Flexibilität anhand des Verlust der Foxp3-Expression gedeutet aufwiesen, exprimierten fast alle *ex vivo* isolierten nTreg-Zellen in dem Infektionsmausmodell weiterhin ihren spezifischen Transkriptionsfaktor. Eine Expression des Th2-spezifischen Zytokins IL-4 war lediglich in einer sehr geringen Frequenz zu beobachten, so dass anzunehmen ist, dass Treg-Zellen während einer Parasiten-gerichteten Immunantwort *in vivo* eine stabile T-Zellpopulation darstellen. Diese Stabilität scheint auch unter einer Typ-1-Immunantwort in der Maus aufrecht erhalten zu werden. In einem Modell für *Listeria*-Infektionen wurde ebenfalls ein stabiler Phänotyp von nTreg-Zellen gefunden (Rubtsov et al., 2010). Widersprüchlich sind hingegen Befunde, die verdeutlichen, dass *ex vivo* isolierte nTregs im Gegensatz zu iTregs durchaus IL-17- und IFN- γ exprimieren können (Wei et al., 2009; Yang et al., 2008a; Zhou et al., 2009). Ebenso stellen sich Daten einer genomweiten Analyse von Histonmethylierungsmustern der Promotoren der Gene *Il4*, *Ifng* und *Il17* in Treg-Zellen gegensätzlich zu den aufgeführten Beobachtungen dar. Zwar konnten weder repressive (H3K27me3) noch offene (H3K4me3) Methylierungsmuster an den Zytokinpromotoren, aber ein bivalenter Status über den Promotoren der Faktoren T-bet und GATA3 gefunden werden (Wei et al., 2009). Daher argumentierten die Autoren, dass eine IFN- γ -Expression grundsätzlich möglich ist und

bewiesen dies anhand von *in vitro* Repolarisierungsexperimenten. Zusätzlich beschrieben sie, dass das IL-4-Gen in nTreg-Zellen keine repressiven Histonmodifikationen aufweist und vermuteten daher, dass Treg-Zellen eine ähnliche Flexibilität zur Produktion von IL-4 besitzen. Die Daten der hier beschriebenen Repolarisationsexperimente, die eine Redifferenzierung von Treg- hin zu Th2-Zellen nahezu ausschließen, widersprechen diesem Befund jedoch deutlich. Um diese Diskrepanz zu klären und weitere Hinweise auf die Regulation der CD4⁺ Effektorzellplastizität sowie der Differenzierung zu erhalten, wäre eine Reanalyse der Histonmodifikationen der hier vorgestellten flexiblen Th1- und Th17-Zellen sowie der stabilen Treg-Zellen notwendig. Diese konnten jedoch nicht aufgrund der geringen Frequenz an wiedergefundenen Spenderzellen durchgeführt werden. Das entwickelte Nb/OVA-Modell erlaubte zwar die Plastizität der verschiedenen Subtypen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, ist jedoch dadurch und aufgrund der limitierenden Spenderzellfrequenz für die Durchführung weiterführender und umfangreicherer Experimente begrenzt. Im Zusammenhang mit den epigenetischen Genomanalysen wäre insbesondere ein Vergleich der Methylierungsmuster von repolarisierten Spenderzellen, die einen doppelten Phänotyp aufwiesen, interessant. Die Zytokinkoexpression von IFN- γ und IL-4 wurde schon in den frühen 90er Jahren beschrieben und diese sogenannten Th0-Zellen als Vorläuferzellen in einer frühen Immunantwort, die sich noch nicht für eine Differenzierungsrichtung entschieden haben, gedeutet (Miner et al., 1998; Street et al., 1990). Aktuellere Daten konnten diesen dualen Subtypen allerdings auch innerhalb von CD4⁺-Gedächtniszellen wiederfinden (Ahmadzadeh et al., 2002; Messi et al., 2003). Darüber hinaus demonstrierten Löhning et al. das adoptiv transferierte Th2-Zellen, nach einer 30-tägigen Inkubationszeit in der Maus, durch eine LCMV-Infektion in einen „Th2+1“-Phänotyp *in vivo* konvertieren (Löhning et al., 2008). Die Repolarisierung der Gedächtniszellen resultierte in 30% IL-4⁺IFN- γ ⁺ und 50-60% vollständig repolarisierten IL-4⁺IFN- γ ⁺ Zellen. Möglicherweise lässt sich aber durch den langen Zeitraum und dem Transfer von FACS-gereinigten Ausgangspopulationen ein hinauswachsen von kontaminierenden nicht-ausdifferenzierten Zellen, die eine spätere IL-4⁺IFN- γ ⁺ Population darstellten, nicht ausschließen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Plastizität bezieht sich im Gegensatz ausschließlich auf 5-tägig stimulierte, aber ausdifferenzierte CD4⁺-Effektorzellen. Parallel wurden jedoch in einigen Pilot-Transfereperimenten die Plastizität von *in vitro* differenzierten Th1- und Th2-Langzeitkulturen versucht, anhand des Nb/OVA-Modells bzw. durch die Infektion der Empfängertiere mit dem beschriebenen MVA-OVA Impfvektor zu überprüfen (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen konnten jedoch vermutlich aufgrund einer fehlenden Expansion in den Empfängertieren nicht wiedergefunden werden. Daher liegen bis auf die aufgeführten, spärlichen Hinweise zur Flexibilität von Gedächtniszellen, bisher keine eindeutigen Belege für die Existenz solch eines Mechanismus in Gedächtniszellen *in vivo* vor.

Zusammenfassend betrachtet konnte durch die Entwicklung und Verwendung des

Helminthen-/Zelltransfermodells die Plastizität des Phänotyps von Th1- und Th17-Zellen *in vivo* demonstriert werden. Entsprechend ihrer wichtigen immunregulatorischen Funktionen wiesen Treg-Zellen diese Flexibilität jedoch nicht auf. Trotz dieser neuen Erkenntnisse zu CD4⁺ T-Effektorzellplastizität bleibt die Frage der funktionellen Relevanz solch eines flexiblen Phänotyps vollständig unbeantwortet. Eine physiologische Rolle dieser Flexibilität wird immer wiederkehrend in Organismen mit fortgeschrittenem Alter diskutiert, da durch die begrenzte Anzahl an *de novo* Immunantworten und der Involution des Thymus nur noch ein begrenztes T-Zellrepertoire und geringer Pool naiver T-Zellen vorliegt (Bluestone et al., 2009; Zhu et al., 2010a). Dies würde aber durch die zumeist hoch antigen-spezifischen T-Zellantworten, eine sehr unwahrscheinliche Kreuzreaktivität eines Erregers voraussetzen, der obendrein einer entgegengesetzt-gerichteten T-Helferzellimmunantwort bedarf. Nichtsdestotrotz könnte diese Effektorzellplastizität therapeutisch genutzt werden, um chronische Allergien oder autoimmune Erkrankungen zu behandeln.

Aufgrund der vorgestellten Daten, die eine Polarisierung von antigen-spezifischen Th1 und Th17-Effektorzellen durch den Helminthen im Transfermodell zeigten und der einleitend erläuterten inversen Korrelation von Helmintheninfektionen und dem Schutz vor autoimmunen und allergischen Erkrankungen, wurden zwei autoimmune Mausmodelle in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es sollte zunächst herausgefunden werden, ob eine *N.-brasiliensis*-Infektion die Erkrankung modulieren oder vor ihrer Initiierung schützen kann und ob eine Repolarisierung von Th-Effektorzellen ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus sein könnte. In den drei beschriebenen EAE-Modellen war jedoch mit vereinzelt Ausnahmen an Mäusen, die spontan an EAE erkrankten und eine Verbesserung der Paralyse einen Tag bis zu einer Woche nach der Parasiteninfektion zeigten, kein eindeutiger und signifikanter Effekt durch die induzierte Typ-2-Immunantwort zu beobachten. Die transienten Verbesserungen durch die Infektionen, konnten dabei ausschließlich in Mäusen die eine Diaparese, aber keine fortgeschrittenen Klassifizierungen aufwiesen, ausgemacht werden. Dies und das Ausbleiben des geringen Effekts im aktiven EAE bzw. passiven Transfermodells, lässt vermuten, dass die induzierte Th2-Antwort nicht vollständig stattfinden kann und im Vergleich zu der dominierenden entzündlichen Th1/Th17-Antwort schwächer ausfällt. Dieser transiente Effekt, der rein subjektiver Beobachtungen unterlag, ließ sich jedoch nicht gezielt reproduzieren, weshalb auf eine weiterführende und grundlegende Untersuchung des Tiermodells verzichtet wurde. Grundsätzlich scheint jedoch eine Modulation von EAE-Mausmodellen durch den Helminthen *Schistosoma mansoni* möglich (La Flamme et al., 2003; Sewell et al., 2003). Die Infektion von EAE-Mäusen resultierte in einer signifikanten Milderung der Pathogenese. Darüber hinaus konnten sowohl in der Peripherie als auch im zentralen Nervensystem reduzierte IFN- γ - aber erhöhte IL-4-, TGF- β - und IL-10-Level gefunden werden. Interessanterweise wurde auch eine erhöhte Frequenz von IL-4-produzierenden neuroantigen-spezifischen T-Zellen beschrieben,

was auf eine mögliche Repolarisierung hindeuten könnte.

Im Gegensatz zu den EAE-Mausmodellen wies eine Infektion des Colitis-Transfermodells mit dem Helminthen *N. brasiliensis* eine transiente aber deutliche Modulation der Pathogenese auf. Dennoch war es auch in diesem Modell nicht gelungen, die Induktion der Erkrankungen zu verhindern. Trotz einer anhaltenden Präsenz der Parasiten im Dünndarm setzte sich die Erkrankung unabhängig vom getesteten Mausstammhintergrund nach der akuten Infektionsphase fort. Eine weiterführende Untersuchung der protektiven Mechanismen während der induzierten Colitis konnte abschließend nicht mehr durchgeführt werden. Vermutlich liegen der Immunmodulation durch *N. brasiliensis* auch im Kontext der entzündlichen Darmerkrankung ähnliche Mechanismen wie sie auch für andere Typ 2-Immunantworten induzierende Wurmparasiten beschrieben sind, zugrunde. In Mausmodellen von Atemwegserkrankungen ist eine DC-vermittelte Induktion von regulatorischen T-Zellen sowie eine Zunahme immunregulatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen, durch *Heligmosomoides polygyrus* bekannt (Taylor et al., 2006a; Wilson et al., 2005). Dabei scheint der Nematode eine Treg-Induktion ausgehend von naiven Zellen *de novo* zu induzieren (Grainger et al., 2010). Diese Induktion von regulatorischen T-Zellen durch *N. brasiliensis* konnte jedoch durch Transferexperimente ausgehend von naiven Zellen in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Vielmehr scheinen die ausschließlich geringen Frequenzen an Treg-Zellen in den mesenterischen Lymphknoten rekrutiert zu werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass Helminthen entzündliche Th1- und Th17-Zellen zu protektiven Th2-Zellen umpolarisieren können und so zu einem milderem Krankheitsverlauf in autoimmunen Erkrankungen beitragen können. Dieser immunmodulierende Mechanismus konnte jedoch in den beiden verwendeten Mausmodellen nicht aufgedeckt werden. Ein direkter Nachweis und eine weiterführende Untersuchung war durch die unzureichend synchrone Induktion, aber dem dennoch sehr starken und raschem Voranschreiten der EAE, nicht möglich. Auch erlaubte der nicht mehr ausreichende Zeitrahmen bei den Colitis-Transferexperimenten keine weiterführenden Experimente mehr, um den postulierten, transienten Modulationseffekt zu untersuchen.

Eine mögliche Repolarisierung könnte jedoch dabei ausgehend von IL-4, das während der Infektion von eosinophilen und basophilen Granulozyten sekretiert wird, in Kombination mit bisher unbekannten IL-4-unabhängigen Signalwegen eingeleitet werden. Eine weiterführende Suppression der T-Zellantwort könnte zudem durch *Programmed Death*-Ligand 2 (PD-L2) vermittelte Signale ausgehend von alternativ-aktivierten Makrophagen erzielt werden. Diese könnten durch sekretiertes IL-4 und IL-13 von Th2-Zellen aktiviert werden und über die Wechselwirkung von PD-L2 zu PD-1-Rezeptoren T-Zellen direkt inhibieren (Huber et al., 2010; Nair et al., 2009).

Mit Hilfe des vorgestellten Helminthen/Maustransfermodells war es erstmals möglich einen

direkten Nachweis für die Repolarisierung antigenspezifischer T-Helferzellen durch eine Helmintheninfektion zu erbringen. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnten neue Medikamente für die Behandlung autoimmuner oder chronischer Erkrankungen entwickelt werden. Für eine zukünftige und sichere therapeutische Anwendung ist allerdings, da die molekularen Mechanismen der Helminthen-induzierten Immunmodulation weitgehend unbekannt sind, weitere Forschung notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, C., and J.H. Cho. 2009a. IL-23 and autoimmunity: new insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 60:97-110.
- Abraham, C., and J.H. Cho. 2009b. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361:2066-2078.
- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.
- Adamson, A.S., K. Collins, A. Laurence, and J.J. O'Shea. 2009. The Current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players. *Curr Opin Immunol* 21:161-166.
- Agarwal, S., and A. Rao. 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9:765-775.
- Ahern, P.P., C. Schiering, S. Buonocore, M.J. McGeachy, D.J. Cua, K.J. Maloy, and F. Powrie. 2010. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 33:279-288.
- Ahmadzadeh, M., and D.L. Farber. 2002. Functional plasticity of an antigen-specific memory CD4 T cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11802-11807.
- Akimzhanov, A.M., X.O. Yang, and C. Dong. 2007. Chromatin remodeling of interleukin-17 (IL-17)-IL-17F cytokine gene locus during inflammatory helper T cell differentiation. *J Biol Chem* 282:5969-5972.
- Altman, J.D., P.A. Moss, P.J. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael, and M.M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94-96.
- Amsen, D., A. Antov, D. Jankovic, A. Sher, F. Radtke, A. Souabni, M. Busslinger, B. McCright, T. Gridley, and R.A. Flavell. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27:89-99.
- Amsen, D., J.M. Blander, G.R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R.A. Flavell. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526.
- Andres, P.G., and L.S. Friedman. 1999. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28:255-281, vii.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204:1849-1861.
- Ansel, K.M., I. Djuretic, B. Tanasa, and A. Rao. 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 24:607-656.

- Aranda, R., B.C. Sydora, P.L. McAllister, S.W. Binder, H.Y. Yang, S.R. Targan, and M. Kronenberg. 1997. Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RB^{high} T cells to SCID recipients. *J Immunol* 158:3464-3473.
- Artis, D., M.L. Wang, S.A. Keilbaugh, W. He, M. Brenes, G.P. Swain, P.A. Knight, D.D. Donaldson, M.A. Lazar, H.R. Miller, G.A. Schad, P. Scott, and G.D. Wu. 2004. RELM β /FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13596-13600.
- Bach, J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347:911-920.
- Baermann, G. 1917. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Nederl.-Indie*. 57:131-137.
- Belkaid, Y., and B.T. Rouse. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6:353-360.
- Bending, D., H. De La Pena, M. Veldhoen, J.M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger, and A. Cooke. 2009. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 119:565-572.
- Bettelli, E., D. Baeten, A. Jager, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2006a. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J Clin Invest* 116:2393-2402.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006b. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
- Bettelli, E., M. Pagany, H.L. Weiner, C. Linington, R.A. Sobel, and V.K. Kuchroo. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med* 197:1073-1081.
- Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, and B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- Brabb, T., A.W. Goldrath, P. von Dassow, A. Paez, H.D. Liggitt, and J. Goverman. 1997. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol* 159:497-507.
- Braun-Fahrlander, C. 2002. Does the 'hygiene hypothesis' provide an explanation for the relatively low prevalence of asthma in Bangladesh? *Int J Epidemiol* 31:488-489.
- Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T.W. Mak, T. Kamradt, and M. Lohoff. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958-966.
- Cepok, S., D. Zhou, R. Srivastava, S. Nessler, S. Stei, K. Bussow, N. Sommer, and B. Hemmer. 2005. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115:1352-1360.
- Christen, U., and M.G. von Herrath. 2005. Infections and autoimmunity--good or bad? *J Immunol* 174:7481-7486.
- Cohen, C.J., S.Q. Crome, K.G. Macdonald, E.L. Dai, D.L. Mager, and M.K. Levings. 2011.

- Human Th1 and th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor Loci. *J Immunol* 187:5615-5626.
- Coo, H., and K.J. Aronson. 2004. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology* 23:1-12.
- Cook, M.J. 1956. The Anatomy of the Laboratory Mouse
. *Academic Press*
- Cooke, A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology* 126:12-17.
- Correale, J., and M. Farez. 2007. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61:97-108.
- Correale, J., and M.F. Farez. 2011. The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 233:6-11.
- Croxford, A.L., and T. Buch. 2011. Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned. *Immunology* 132:1-8.
- Dabbagh, K., K. Takeyama, H.M. Lee, I.F. Ueki, J.A. Lausier, and J.A. Nadel. 1999. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol* 162:6233-6237.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R.A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T.B. Strom, W. Elyaman, I.C. Ho, S. Khoury, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* 9:1347-1355.
- Dean, G., and J.F. Kurtzke. 1971. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3:725-729.
- Dent, L.A., M. Strath, A.L. Mellor, and C.J. Sanderson. 1990. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* 172:1425-1431.
- Djuretic, I.M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao, and K.M. Ansel. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8:145-153.
- Dong, C. 2009. Mouse Th17 cells: current understanding of their generation and regulation. *Eur J Immunol* 39:640-644.
- Dunne, D.W., and A. Cooke. 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 5:420-426.
- Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick. 2004a. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 3:104-110.
- Dyment, D.A., J.L. Steckley, K. Morrison, C.J. Willer, M.Z. Cader, G.C. DeLuca, A.D. Sadovnick, N. Risch, and G.C. Ebers. 2004b. TCR beta polymorphisms and multiple sclerosis. *Genes Immun* 5:337-342.
- Elliott, D.E., R.W. Summers, and J.V. Weinstock. 2007. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int J Parasitol* 37:457-464.

- Elson, C.O., Y. Cong, C.T. Weaver, T.R. Schoeb, T.K. McClanahan, R.B. Fick, and R.A. Kastelein. 2007. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology* 132:2359-2370.
- Elyaman, W., E.M. Bradshaw, C. Uyttenhove, V. Dardalhon, A. Awasthi, J. Imitola, E. Bettelli, M. Oukka, J. van Snick, J.C. Renauld, V.K. Kuchroo, and S.J. Khoury. 2009. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12885-12890.
- Fais, S., M.R. Capobianchi, F. Pallone, P. Di Marco, M. Boirivant, F. Dianzani, and A. Torsoli. 1991. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of *in vitro* response to interferon gamma inducers. *Gut* 32:403-407.
- Fantini, M.C., C. Becker, I. Tubbe, A. Nikolaev, H.A. Lehr, P. Galle, and M.F. Neurath. 2006. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 55:671-680.
- Ferrandon, D., J.L. Imler, C. Hetru, and J.A. Hoffmann. 2007. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7:862-874.
- Fiocchi, C., M.L. Hilfiker, K.R. Youngman, N.C. Doerder, and J.H. Finke. 1984. Interleukin 2 activity of human intestinal mucosa mononuclear cells. Decreased levels in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86:734-742.
- Floess, S., J. Freyer, C. Siewert, U. Baron, S. Olek, J. Polansky, K. Schlawe, H.D. Chang, T. Bopp, E. Schmitt, S. Klein-Hessling, E. Serfling, A. Hamann, and J. Huehn. 2007. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e38.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Fuss, I.J., M. Neurath, M. Boirivant, J.S. Klein, C. de la Motte, S.A. Strong, C. Fiocchi, and W. Strober. 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157:1261-1270.
- Gasteiger, G., W. Kastenmuller, R. Ljapoci, G. Sutter, and I. Drexler. 2007. Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines. *J Virol* 81:11925-11936.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X.P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467:967-971.
- Gilden, D.H. 2005. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4:195-202.
- Gold, R., C. Linington, and H. Lassmann. 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129:1953-1971.
- Grainger, J.R., K.A. Smith, J.P. Hewitson, H.J. McSorley, Y. Harcus, K.J. Filbey, C.A. Finney,

- E.J. Greenwood, D.P. Knox, M.S. Wilson, Y. Belkaid, A.Y. Rudensky, and R.M. Maizels. 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med* 207:2331-2341.
- Gran, B., B. Hemmer, M. Vergelli, H.F. McFarland, and R. Martin. 1999. Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 45:559-567.
- Grogan, J.L., and R.M. Locksley. 2002. T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol* 14:366-372.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Haley, A.J. 1962. Biology of the rat nematode, *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). II. Preparastic stages and development in the laboratory rat. *J Parasitol* 48:13-23.
- Harnett, W., and M.M. Harnett. 2006. Filarial nematode secreted product ES-62 is an anti-inflammatory agent: therapeutic potential of small molecule derivatives and ES-62 peptide mimetics. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:511-518.
- Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
- Hatton, R.D., L.E. Harrington, R.J. Luther, T. Wakefield, K.M. Janowski, J.R. Oliver, R.L. Lallone, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2006. A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. *Immunity* 25:717-729.
- Hegazy, A.N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D.D. Pinschewer, A. Radbruch, and M. Lohning. 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32:116-128.
- Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, J. Mankertz, A.H. Gitter, N. Burgel, M. Fromm, M. Zeitz, I. Fuss, W. Strober, and J.D. Schulzke. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129:550-564.
- Heller, F., I.J. Fuss, E.E. Nieuwenhuis, R.S. Blumberg, and W. Strober. 2002. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17:629-638.
- Herbert, D.R., C. Holscher, M. Mohrs, B. Arendse, A. Schwegmann, M. Radwanska, M. Leeto, R. Kirsch, P. Hall, H. Mossmann, B. Claussen, I. Forster, and F. Brombacher. 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20:623-635.
- Hirahara, K., K. Ghoreschi, A. Laurence, X.P. Yang, Y. Kanno, and J.J. O'Shea. 2010. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:425-434.
- Hirahara, K., G. Vahedi, K. Ghoreschi, X.P. Yang, S. Nakayamada, Y. Kanno, J.J. O'Shea, and A. Laurence. 2011. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology* 134:235-245.

- Hirota, K., J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D.J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A.J. Potocnik, and B. Stockinger. 2011. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12:255-263.
- Ho, I.C., T.S. Tai, and S.Y. Pai. 2009. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:125-135.
- Holland, M.J., Y.M. Hargus, P.L. Riches, and R.M. Maizels. 2000. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol* 30:1977-1987.
- Honma, K., D. Kimura, N. Tominaga, M. Miyakoda, T. Matsuyama, and K. Yui. 2008. Interferon regulatory factor 4 differentially regulates the production of Th2 cytokines in naive vs. effector/memory CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15890-15895.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Hou, J., U. Schindler, W.J. Henzel, T.C. Ho, M. Brasseur, and S.L. McKnight. 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265:1701-1706.
- Hsieh, C.S., Y. Liang, A.J. Tzysnik, S.G. Self, D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21:267-277.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260:547-549.
- Huber, S., R. Hoffmann, F. Muskens, and D. Voehringer. 2010. Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood* 116:3311-3320.
- Hwang, E.S., S.J. Szabo, P.L. Schwartzberg, and L.H. Glimcher. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307:430-433.
- Ivanov, I.I., B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelletier, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
- Izcue, A., J.L. Coombes, and F. Powrie. 2009. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol* 27:313-338.
- Janson, P.C., L.B. Linton, E.A. Bergman, P. Marits, M. Eberhardson, F. Piehl, V. Malmstrom, and O. Winqvist. 2011. Profiling of CD4+ T cells with epigenetic immune lineage analysis. *J Immunol* 186:92-102.
- Josefowicz, S.Z., and A. Rudensky. 2009. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 30:616-625.
- Kamradt, T., R. Goggel, and K.J. Erb. 2005. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol* 26:260-267.
- Kebir, H., I. Ifergan, J.I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, and A. Prat. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66:390-402.

- Kim, H.P., and W.J. Leonard. 2007. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation. *J Exp Med* 204:1543-1551.
- Kjellev, S., D. Lundsgaard, S.S. Poulsen, and H. Markholst. 2006. Reconstitution of Scid mice with CD4+CD25- T cells leads to rapid colitis: an improved model for pharmacologic testing. *Int Immunopharmacol* 6:1341-1354.
- Komatsu, N., M.E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1903-1908.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Krawczyk, C.M., H. Shen, and E.J. Pearce. 2007. Functional plasticity in memory T helper cell responses. *J Immunol* 178:4080-4088.
- Krishnamoorthy, G., H. Lassmann, H. Wekerle, and A. Holz. 2006. Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J Clin Invest* 116:2385-2392.
- La Flamme, A.C., K. Ruddenklau, and B.T. Backstrom. 2003. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun* 71:4996-5004.
- Lafaille, J.J., K. Nagashima, M. Katsuki, and S. Tonegawa. 1994. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78:399-408.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, and T. Sparwasser. 2007. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* 204:57-63.
- Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Lantz, C.S., J. Boesiger, C.H. Song, N. Mach, T. Kobayashi, R.C. Mulligan, Y. Nawa, G. Dranoff, and S.J. Galli. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90-93.
- Lassmann, H. 2007. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 163:651-655.
- Laurence, A., C.M. Tato, T.S. Davidson, Y. Kanno, Z. Chen, Z. Yao, R.B. Blank, F. Meylan, R. Siegel, L. Hennighausen, E.M. Shevach, and J. O'Shea. 2007. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371-381.
- Lazarevic, V., X. Chen, J.H. Shim, E.S. Hwang, E. Jang, A.N. Bolm, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and L.H. Glimcher. 2011. T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat. *Nat Immunol* 12:96-104.
- Le Gros, G., S.Z. Ben-Sasson, R. Seder, F.D. Finkelman, and W.E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells *in vivo* and *in vitro*: IL-2 and IL-4 are required for *in vitro* generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172:921-929.

- Lee, G.R., S.T. Kim, C.G. Spilianakis, P.E. Fields, and R.A. Flavell. 2006. T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity* 24:369-379.
- Lee, H.J., N. Takemoto, H. Kurata, Y. Kamogawa, S. Miyatake, A. O'Garra, and N. Arai. 2000. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J Exp Med* 192:105-115.
- Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107.
- Lexberg, M.H., A. Taubner, I. Albrecht, I. Lepenies, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, and H.D. Chang. 2010. IFN-gamma and IL-12 synergize to convert *in vivo* generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur J Immunol* 40:3017-3027.
- Lighvani, A.A., D.M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B.D. Hissong, B.V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W.E. Paul, and J.J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15137-15142.
- Linthicum, D.S., J.J. Munoz, and A. Blaskett. 1982. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol* 73:299-310.
- Litzenburger, T., R. Fassler, J. Bauer, H. Lassmann, C. Linington, H. Wekerle, and A. Iglesias. 1998. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188:169-180.
- Liu, Z., Q. Liu, H. Hamed, R.M. Anthony, A. Foster, F.D. Finkelman, J.F. Urban, Jr., and W.C. Gause. 2005. IL-2 and autocrine IL-4 drive the *in vivo* development of antigen-specific Th2 T cells elicited by nematode parasites. *J Immunol* 174:2242-2249.
- Loftus, E.V., Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 126:1504-1517.
- Lohning, M., A.N. Hegazy, D.D. Pinschewer, D. Busse, A. Radbruch, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 2008. Long-lived virus-reactive memory T cells generated from purified cytokine-secreting T helper type 1 and type 2 effectors. *J Exp Med* 205:53-61.
- Loke, P., A.S. MacDonald, A. Robb, R.M. Maizels, and J.E. Allen. 2000. Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *Eur J Immunol* 30:2669-2678.
- Lu, L.F., E.F. Lind, D.C. Gondek, K.A. Bennett, M.W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z.A. Scott, A.J. Coyle, J.L. Reed, J. Van Snick, T.B. Strom, X.X. Zheng, and R.J. Noelle. 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.
- MacDonald, A.S., P. Loke, and J.E. Allen. 1999. Suppressive antigen-presenting cells in Helminth infection. *Pathobiology* 67:265-268.
- Maizels, R.M., A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M.D. Taylor, and J.E. Allen. 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201:89-116.
- Maizels, R.M., N. Gomez-Escobar, W.F. Gregory, J. Murray, and X. Zang. 2001. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 31:889-898.

- Maizels, R.M., and M. Yazdanbakhsh. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 3:733-744.
- Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
- McGeachy, M.J., K.S. Bak-Jensen, Y. Chen, C.M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan, and D.J. Cua. 2007. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390-1397.
- McGovern, D., and F. Powrie. 2007. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 56:1333-1336.
- McKay, D.M. 2009. The therapeutic helminth? *Trends Parasitol* 25:109-114.
- McKenzie, G.J., P.G. Fallon, C.L. Emson, R.K. Grencis, and A.N. McKenzie. 1999. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med* 189:1565-1572.
- Messi, M., I. Giacchetto, K. Nagata, A. Lanzavecchia, G. Natoli, and F. Sallusto. 2003. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* 4:78-86.
- Min, B., and W.E. Paul. 2005. Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Semin Immunol* 17:201-207.
- Miner, K.T., and M. Croft. 1998. Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol* 160:5280-5287.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911.
- Mohr, C.A., J. Arapovic, H. Muhlbach, M. Panzer, A. Weyn, L. Dolken, A. Krmpotic, D. Voehringer, U. Koszinowski, and T. Sacher. 2010. A spread-deficient cytomegalovirus for assessment of first-target cells in vaccination. *J Virol* 84:7730-7742.
- Mohrs, M., K. Shinkai, K. Mohrs, and R.M. Locksley. 2001. Analysis of type 2 immunity *in vivo* with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity* 15:303-311.
- Monteleone, G., L. Biancone, R. Marasco, G. Morrone, O. Marasco, F. Luzzza, and F. Pallone. 1997. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112:1169-1178.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.
- Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
- Mullen, A.C., A.S. Hutchins, F.A. High, H.W. Lee, K.J. Sykes, L.A. Chodosh, and S.L. Reiner. 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1

- gene induction. *Nat Immunol* 3:652-658.
- Mullen, C.A. 2002. Influence of tumor vaccines on graft versus tumor activity and graft versus host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 43:503-510.
- Mullin, G.E., A.J. Lazenby, M.L. Harris, T.M. Bayless, and S.P. James. 1992. Increased interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1620-1627.
- Mullis, K.B., and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Murphy, C.A., C.L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R.A. Kastelein, J.D. Sedgwick, and D.J. Cua. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951-1957.
- Murphy, E., K. Shibuya, N. Hosken, P. Openshaw, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1996. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 183:901-913.
- Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α 0 thymocytes *in vivo*. *Science* 250:1720-1723.
- Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
- Murphy, K.M., and B. Stockinger. 2010. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 11:674-680.
- Nair, M.G., Y. Du, J.G. Perrigoue, C. Zaph, J.J. Taylor, M. Goldschmidt, G.P. Swain, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A. Murphy, M. Karow, S. Stevens, E.J. Pearce, and D. Artis. 2009. Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med* 206:937-952.
- Nowak, E.C., C.T. Weaver, H. Turner, S. Begum-Haque, B. Becher, B. Schreiner, A.J. Coyle, L.H. Kasper, and R.J. Noelle. 2009. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* 206:1653-1660.
- O'Shea, J.J., and W.E. Paul. 2010. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327:1098-1102.
- Ogilvie, B.M., and V.E. Jones. 1971. Parasitological review. *Nippostrongylus brasiliensis*: a review of immunity and host-parasite relationship in the rat. *Exp Parasitol* 29:138-177.
- Olerup, O., and J. Hillert. 1991. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38:1-15.
- Ostanin, D.V., J. Bao, I. Koboziev, L. Gray, M. Kosloski-Davidson, V.H. Price, and M.B. Grisham. 2009. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G135-146.
- Ouyang, W., S.H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W.C. Sha, and K.M. Murphy. 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9:745-755.
- Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q.

- Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.
- Pettinelli, C.B., and D.E. McFarlin. 1981. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after *in vitro* activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 127:1420-1423.
- Piddlesden, S.J., H. Lassmann, F. Zimprich, B.P. Morgan, and C. Linington. 1993. The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 143:555-564.
- Powrie, F., S. Mauze, and R.L. Coffman. 1997. CD4+ T-cells in the regulation of inflammatory responses in the intestine. *Res Immunol* 148:576-581.
- Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
- Robertson, J.M., P.E. Jensen, and B.D. Evavold. 2000. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 164:4706-4712.
- Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18:263-266.
- Rook, G.A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 126:3-11.
- Rubtsov, Y.P., R.E. Niec, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist, and A.Y. Rudensky. 2010. Stability of the regulatory T cell lineage *in vivo*. *Science* 329:1667-1671.
- Ryan, C.A., A. Huffaker, and Y. Yamaguchi. 2007. New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol* 9:1902-1908.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
- Sarra, M., F. Pallone, T.T. Macdonald, and G. Monteleone. 2010. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 16:1808-1813.
- Scheu, S., D.B. Stetson, R.L. Reinhardt, J.H. Leber, M. Mohrs, and R.M. Locksley. 2006. Activation of the integrated stress response during T helper cell differentiation. *Nat Immunol* 7:644-651.
- Schoenborn, J.R., M.O. Dorschner, M. Sekimata, D.M. Santer, M. Shnyreva, D.R. Fitzpatrick, J.A. Stamatoyannopoulos, and C.B. Wilson. 2007. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. *Nat Immunol* 8:732-742.
- Schulz, E.G., L. Mariani, A. Radbruch, and T. Hofer. 2009. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30:673-683.
- Schwartz, R.H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6:327-330.
- Sewell, D., Z. Qing, E. Reinke, D. Elliot, J. Weinstock, M. Sandor, and Z. Fabry. 2003. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova

- immunization. *Int Immunol* 15:59-69.
- Shamshiev, A., A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, and G. De Libero. 1999. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur J Immunol* 29:1667-1675.
- Shanahan, F., and C.N. Bernstein. 2009. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 25:301-305.
- Shi, G., C.A. Cox, B.P. Vistica, C. Tan, E.F. Wawrousek, and I. Gery. 2008. Phenotype switching by inflammation-inducing polarized Th17 cells, but not by Th1 cells. *J Immunol* 181:7205-7213.
- Shinkai, K., M. Mohrs, and R.M. Locksley. 2002. Helper T cells regulate type-2 innate immunity *in vivo*. *Nature* 420:825-829.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A.M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
- Siracusa, M.C., J.J. Reece, J.F. Urban, Jr., and A.L. Scott. 2008. Dynamics of lung macrophage activation in response to helminth infection. *J Leukoc Biol* 84:1422-1433.
- Smith, P., R.E. Fallon, N.E. Mangan, C.M. Walsh, M. Saraiva, J.R. Sayers, A.N. McKenzie, A. Alcami, and P.G. Fallon. 2005. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 202:1319-1325.
- Smits, H.H., J.G. van Rietschoten, C.M. Hilkens, R. Sayilir, F. Stiekema, M.L. Kapsenberg, and E.A. Wierenga. 2001. IL-12-induced reversal of human Th2 cells is accompanied by full restoration of IL-12 responsiveness and loss of GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 31:1055-1065.
- Snapper, C.M., F.D. Finkelman, and W.E. Paul. 1988. Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4. *Immunol Rev* 102:51-75.
- Solomon, M.S., and A.J. Haley. 1966. Biology of the Rat Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914). V. Characteristics of *N. brasiliensis* after Serial Passage in the Laboratory Mouse. *The Journal of Parasitology* 52:237-241.
- Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.
- Storch, M.K., S. Piddlesden, M. Haltia, M. Iivanainen, P. Morgan, and H. Lassmann. 1998. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43:465-471.
- Strachan, D.P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299:1259-1260.
- Strachan, D.P. 2000. Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax* 55 Suppl 1:S2-10.
- Street, N.E., J.H. Schumacher, T.A. Fong, H. Bass, D.F. Fiorentino, J.A. Leverah, and T.R. Mosmann. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 144:1629-1639.
- Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon. 2007. The fundamental basis of inflammatory bowel

- disease. *J Clin Invest* 117:514-521.
- Summers, R.W., D.E. Elliott, J.F. Urban, Jr., R. Thompson, and J.V. Weinstock. 2005. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut* 54:87-90.
- Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.
- Taylor, J.J., M. Mohrs, and E.J. Pearce. 2006a. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol* 176:5839-5847.
- Taylor, M.D., A. Harris, M.G. Nair, R.M. Maizels, and J.E. Allen. 2006b. F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol* 176:6918-6927.
- Uhlig, H.H., and F. Powrie. 2009. Mouse models of intestinal inflammation as tools to understand the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 39:2021-2026.
- Urban, J.F., Jr., N. Noben-Trauth, D.D. Donaldson, K.B. Madden, S.C. Morris, M. Collins, and F.D. Finkelman. 1998. IL-13, IL-4 α , and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8:255-264.
- van den Biggelaar, A.H., L.C. Rodrigues, R. van Ree, J.S. van der Zee, Y.C. Hoeksma-Kruize, J.H. Souverein, M.A. Missinou, S. Borrmann, P.G. Kremsner, and M. Yazdanbakhsh. 2004. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis* 189:892-900.
- Van den Broeck, W., A. Derore, and P. Simoens. 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods* 312:12-19.
- Van Ginderachter, J.A., K. Movahedi, G. Hassanzadeh Ghassabeh, S. Meerschaut, A. Beschin, G. Raes, and P. De Baetselier. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211:487-501.
- van Panhuys, N., M. Prout, E. Forbes, W.E. Paul, and G. Le Gros. 2011. Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *J Immunol* 186:2719-2728.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
- Veldhoen, M., C. Uytendhoeve, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, and B. Stockinger. 2008. Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9:1341-1346.
- Voehringer, D., T.A. Reese, X. Huang, K. Shinkai, and R.M. Locksley. 2006. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 203:1435-1446.
- Voehringer, D., K. Shinkai, and R.M. Locksley. 2004. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* 20:267-277.

- Voehringer, D., D. Wu, H.E. Liang, and R.M. Locksley. 2009. Efficient generation of long-distance conditional alleles using recombineering and a dual selection strategy in replicate plates. *BMC Biotechnol* 9:69.
- Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J.E. Cook, J.M. Fletcher, A. McQuaid, J.E. Masters, D.C. Macallan, and A.N. Akbar. 2006. Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J Clin Invest* 116:2423-2433.
- Waldner, H., M.J. Whitters, R.A. Sobel, M. Collins, and V.K. Kuchroo. 2000. Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3412-3417.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2009. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 1:20-36.
- Wang, C.C., T.J. Nolan, G.A. Schad, and D. Abraham. 2001. Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin. *Clin Exp Allergy* 31:495-503.
- Wang, Y.H., K.S. Voo, B. Liu, C.Y. Chen, B. Uygungil, W. Spoede, J.A. Bernstein, D.P. Huston, and Y.J. Liu. 2010. A novel subset of CD4(+) T(H)2 memory/effector cells that produce inflammatory IL-17 cytokine and promote the exacerbation of chronic allergic asthma. *J Exp Med* 207:2479-2491.
- Watkins, A.D., C.A. Hatfield, S.F. Fidler, G.E. Winterrowd, J.R. Brashler, F.F. Sun, B.M. Taylor, J.E. Chin, and I.M. Richards. 1996. Phenotypic analysis of airway eosinophils and lymphocytes in a Th-2-driven murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:20-34.
- Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T.Y. Roh, W.T. Watford, D.E. Schones, W. Peng, H.W. Sun, W.E. Paul, J.J. O'Shea, and K. Zhao. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. *Immunity* 30:155-167.
- Weinstock, J.V., and D.E. Elliott. 2009. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. *Inflamm Bowel Dis* 15:128-133.
- Wekerle, H., K. Kojima, J. Lannes-Vieira, H. Lassmann, and C. Linington. 1994. Animal models. *Ann Neurol* 36 Suppl:S47-53.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T.Y. Neben, C.L. Karp, and D.D. Donaldson. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258-2261.
- Wills-Karp, M., J. Santeliz, and C.L. Karp. 2001. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 1:69-75.
- Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:91-105.
- Wilson, M.S., M.D. Taylor, A. Balic, C.A. Finney, J.R. Lamb, and R.M. Maizels. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 202:1199-1212.
- Wirtz, S., and M.F. Neurath. 2007. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 59:1073-1083.

- Wohlleben, G., C. Trujillo, J. Muller, Y. Ritze, S. Grunewald, U. Tatsch, and K.J. Erb. 2004. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *Int Immunol* 16:585-596.
- Wucherpfennig, K.W., and J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.
- Yang, X.O., R. Nurieva, G.J. Martinez, H.S. Kang, Y. Chung, B.P. Pappu, B. Shah, S.H. Chang, K.S. Schluns, S.S. Watowich, A.M. Jetten, and C. Dong. 2008a. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 29:44-56.
- Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H.S. Kang, Y. Chung, L. Ma, Q. Tian, A.M. Jetten, and C. Dong. 2008b. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28:29-39.
- Yazdanbakhsh, M., and P.M. Matricardi. 2004. Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol* 26:15-24.
- Zaccone, P., Z. Fehervari, F.M. Jones, S. Sidobre, M. Kronenberg, D.W. Dunne, and A. Cooke. 2003. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 33:1439-1449.
- Zheng, W., and R.A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.
- Zhou, L., J.E. Lopes, M.M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G.D. Victora, J. Du, Y.P. Rubtsov, A.Y. Rudensky, S.F. Ziegler, and D.R. Littman. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453:236-240.
- Zhou, M., and W. Ouyang. 2003. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res* 28:25-37.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo*. *Nat Immunol* 10:1000-1007.
- Zhu, J., B. Min, J. Hu-Li, C.J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J.F. Urban, Jr., L. Guo, and W.E. Paul. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5:1157-1165.
- Zhu, J., and W.E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.
- Zhu, J., and W.E. Paul. 2010a. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20:4-12.
- Zhu, J., H. Yamane, L. Guo, and W.E. Paul. 2006. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 16:3-10.
- Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010b. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489.

8 Abkürzungen

Kürzel	Erklärung
4get	<i>IL-4 green fluorescence enhanced transcript</i>
AAM	Alternativ-aktivierte Makrophage
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende-Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) oder Allophycozyanin
BD	Becton Dickinson
BZR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
bio	Biotin/biotinyliert
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFA	Vollständiges Freund-Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
Cy	Zyan (<i>Cyan</i>)
d	Tage (<i>day(s)</i>) oder Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEREG	„ <i>DEpletion of REGulatory T cells</i> “
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid-Triphosphat
EAE	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Verstärktes Grün-fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
FKS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
hi	hoch (<i>high</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	„ <i>Iscoe's Modified Dulbecco's</i> “-Medium
IRES	Interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
IVC	<i>Individually Ventilated Cages</i>

LK	Lymphknoten
lo	niedrig (<i>low</i>)
loxP	<i>locus of X-ing over</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mAk	Monoklonaler Antikörper
MCMV	Maus-Cytomegalovirus
mLN	Mediastinale Lymphknoten
MLN	Mesenterische Lymphknoten
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute(n)
MOG	Myelin-Oligodentrozyten-Glykoprotein
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MVA	modifiziertes <i>Vaccinia Ankara Virus</i>
NES	<i>N. brasiliensis excretory/secretory antigen</i>
Nb	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OVA	Hühner-Ovalbumin
PB	<i>pacific blue</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
pfu	Plaques bildende Einheiten (<i>plaque forming units</i>)
PKH	Paul Karl Horan (Erfinder des Farbstoffs)
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Azetat
PTX	Pertussistoxin
RAG	<i>recombination activating gene</i>
rh	rekombinant human
rm	rekombinant murin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.c.	subcutan
SA	Streptavidin
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SE	Standardfehler (<i>standard error</i>)
SPF	Spezifisch pathogenfrei (<i>specific pathogen free</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TAE	Tris-Acetat
TNB	<i>Tris-buffered saline containing bovine serum albumin</i>
TZR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
Tm	Schmelztemperatur (<i>temperature of melting</i>)
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminoethan
U	Einheit(en) (<i>Unit(s)</i>)

Weitere Abkürzungen entsprechend IUPAC-Nomenklatur.

9 Glossar

Adjuvans	Eine Substanz, welche die Immunogenität von applizierten Substanzen während der Immunisierung von Menschen und Tieren erhöht.
Antigen	Fremde Substanzen, wie Nukleinsäuren, Proteine oder Polysaccharide, die vom Immunsystem erkannt werden und eine Immunantwort auslösen.
CD-Nomenklatur	<i>Cluster of Differentiation</i> („Unterscheidungsgruppen“), eine Nomenklatur die Antikörper gegen zelluläre Oberflächenmerkmale, meist membran-gebundene Glykoproteine, in Gruppen entsprechend ihrer Spezifität einteilt.
Fixierung	Die Konservierung und Strukturstabilisierung von Organen, Geweben und Zellen durch Fixative wie Paraformaldehyd.
Haplotyp	Die Variante einer bestimmten Nukleotidsequenz, innerhalb des selben Gen-Lokus auf einem Chromosom und im Genom eines Lebewesens.
Homöostase	Bezeichnet die Aufrechterhaltung eines dynamischen Gleichgewichtszustands innerhalb eines biologischen Systems.
Kongen	Beziehung zweier Individuen zueinander, die sich ausnehmend in einem Gen nicht genetisch voneinander unterscheiden. z.B. in Mauseinzuchtlinien.
Lymphopenie	Der Mangel an Lymphozyten. Zum Beispiel im Tiermodell durch Bestrahlung oder Gendelektion erzielbar.
Opsonierung	Markierung von Antigenen oder Mikroorganismen durch Antikörper oder Komplementfaktoren zur Phagozytierung durch Granulozyten und Makrophagen.
Pathogenese	Die Entstehung und Entwicklung von Krankheiten mit daran beteiligten Faktoren.
Paralyse	Bezeichnet die Lähmung von Skelettmuskeln und Nervengruppen.
Proliferation	Die Vermehrung von Zellen durch mitotische Zellteilung.
Zytokine	Proteine, welche die Differenzierung, die Proliferation als Wachstumsfaktoren oder die Migration von Zellen beeinflussen können und als Mediatoren für das Immunsystem eine wichtige Rolle spielen.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Plastizität von CD4-positiven T-Lymphozyten im Kontext einer Helmintheninfektion“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.04.2012

Marc Panzer

11 Publikationen & Preise

„Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection.“

Panzer M., Sitte S., Wirth S., Drexler I., Sparwasser T. und Voehringer D.

J Immunol. 2012 Jan 15;188(2):615-23. Epub 2011 Dec 7.

„Protective immunity against hookworms depends on a broad TCR repertoire.“

Seidl A., Panzer M. und Voehringer D.

Immunology. 2011 Oct;134(2):214-23

„Dendritic cell-tropic pathogens suppress inflammation-induced extramedullary hematopoiesis.“ Jordan S., Ruzsics Z., Mitrovic M., Baranek T., Panzer M., Arapovic J., Krmpotic A., Vöhringer D., Vivier E., Adler H., Dalod M., Jonjic S., Dölken L.; Koszinowski U.
Manuskript im Mai 2011 eingereicht.

„Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths.“

Ohnmacht C., Schwartz C., Panzer M., Schiedewitz I., Naumann R. und Voehringer D.

Immunity. 2010 Sep 24;33(3):364-74.

„A spread-deficient cytomegalovirus for assessment of first-target cells in vaccination.“

Mohr CA., Arapovic J., Mühlbach H., Panzer M., Weyn A., Dölken L., Krmpotic A., Voehringer D., Ruzsics Z., Koszinowski U. und Sacher T.

J Virol. 2010 Aug;84(15):7730-42.

Posterpreis: „WIRM III: Special focus on regulatory & effector mechanisms“ 22-25.03.09 Davos, Schweiz; „Functional T helper cell plasticity: In vivo re-polarization of distinct T helper cell subsets by viral and parasitic infections“. Panzer M., Drexler I. und Voehringer D.

12 Danksagung

Vielen herzlichen Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. David Vöhringer. *„Vielen lieben Dank David für deine Betreuung, die Möglichkeit und die Einblicke...die Symposien und deine andauernde Unterstützung!“*

Vielen lieben Dank an das gesamte Institut für Immunologie, Direktor Prof. Dr. Thomas Brocker und vor allem an meine Kollegen für Ihre Hilfsbereitschaft und das familiäre Umfeld. *„Insbesondere möchte ich dir danken Steffi, für deinen unermüdlichen Enthusiasmus, dass du mich tatkräftig unterstützt hast und du eine Freundin warst! Vielen herzlichen Dank nochmals Christian und Adriana für das Korrekturlesen des Papers und der Arbeit! Vielen lieben Dank Andrea und Wolfgang für die gute Verpflegung der Tiere!“*

Vielen Dank an das Labor von Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski. *„Danke Christian und Stefan für die tolle Zusammenarbeit und dafür, dass ich für euch ein paar fruchtbare Experimente machen durfte!“*

Weiterer Dank gilt folgenden Personen für die Bereitstellung von Viren und Mäusen: PD Ingo Drexler, M.D. für den Impfvektor MVA/OVA, Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski für das Virus MCMV- Δ M94-OVA, Prof. Dr. Tim Sparwasser und Prof. Dr. Hartmut Wekerle für die Bereitstellung der DEREK- bzw. 2D2- und 2D2-Th-Mäuse.

„Abschließend gilt der größte Dank dir, Yvonne! Danke dafür, dass du mich lässt wie ich bin, du mir Kraft gibst...und du mich vervollständigst!“

*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas,
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein